



# THÈSE

PRÉSENTÉE A

**L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

ÉCOLE DOCTORALE DIVERSITÉ DU VIVANT

Par **Aude ANDOUCHE**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT

## **Etude au cours du développement de *Sepia officinalis* des structures tégumentaires à l'origine des motifs colorés**

Directrice de recherche : Laure BONNAUD-PONTICELLI

Co-encadrant : Yann BASSAGLIA

Soutenue le : 13 décembre 2013

Devant la commission d'examen formée de :

**Mme Régine VIGNES-LEBBE**, Professeure, Univ. Paris 6  
**Mme Véronique BORDAY-BIRRAUX**, MCF, HDR, Univ. Paris 7  
**M. Roger VILLANUEVA-LÓPEZ**, Directeur de Recherche, CSIC  
**M. Ludovic DICKEL**, Professeur, Université de Caen  
**M. Serge BERTHIER**, Professeur, Univ. Paris 7  
**M. Yann BASSAGLIA**, MCF, Univ. Paris Est Créteil  
**Mme Laure BONNAUD-PONTICELLI**, MCF, HDR, Univ. Paris 7

**Présidente**  
**Rapporteure**  
**Rapporteur**  
**Examineur**  
**Examineur**  
**Co-encadrant**  
**Directrice de thèse**

# Remerciements

Je souhaite remercier en premier lieu les membres de mon jury, qui ont accepté de consacrer une partie de leur temps à évaluer mon travail. Merci à madame Régine VIGNES-LEBBE, présidente du jury, merci à messieurs Ludovic DICKEL et Serge BERTHIER, examinateurs, et merci à madame Véronique BORDAY-BIRRAUX et monsieur Roger VILLANUEVA-LOPEZ, à qui a été confiée la tâche de lire et de juger ce manuscrit.

Merci aussi à monsieur Ludovic DICKEL, madame Véronique BORDAY-BIRRAUX et madame Sylvie DUFOUR pour leur participation à l'avancée de ce travail grâce à leurs remarques et questions constructives au cours des réunions du comité de thèse. Merci de m'avoir permis de prendre du recul sur les résultats obtenus.

Je voudrais remercier le Directeur du Département Milieux et Peuplements aquatiques, monsieur Guy DUHAMEL, et la Directrice de l'UMR BOREA, madame Sylvie DUFOUR, d'avoir accepté la réalisation de cette thèse en parallèle de mes activités d'ingénieur d'étude.

Je tiens tout particulièrement à remercier ma directrice de thèse, Madame Laure BONAUD-PONTICELLI de m'avoir offert l'opportunité d'effectuer cette thèse en parallèle de mes activités d'ingénieur d'étude au sein de l'équipe. Merci pour son investissement dans ce travail et ce, malgré un emploi du temps fort chargé.

Je voudrais aussi remercier Yann BASSAGLIA, co-encadrant de cette thèse, d'avoir accepté de ce joindre à cette aventure et d'y avoir consacré du temps malgré un emploi du temps, là aussi, très chargé.

Je tiens à remercier le dernier (mais non le moindre) membre de l'équipe, Sébastien Baratte. Un grand merci Sébastien pour ton aide, ton soutien, ton enthousiasme communicatif pour la recherche et pour nos nombreuses discussions scientifiques.

Je voudrais également remercier mes collègues de la Direction des collections. Merci à monsieur Michel GUIRAUD pour m'avoir facilité la tâche en m'accordant une décharge de collection pour ma dernière année. Merci à Nadia AMÉZIANE et Pascale JOANNOT pour leur compréhension pendant cette période de doublon. Merci Pascale pour ton soutien et désolée de t'avoir un peu abandonné pendant toute cette année. Je tiens aussi à remercier l'équipe technique « Invertébrés marins non arthropodes terrestres » d'avoir pris le relais dans la gestion des demandes pendant cette période, et plus particulièrement à Pierre LOZOUET, Cyndie DUPOUX et Sébastien SOUBZMAIGNE.

Je voudrais aussi remercier les personnes qui de près ou de loin (géographiquement parlant) ont participé à l'enrichissement de ce travail. Je voudrais remercier l'équipe d'Anna PALUMBO de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire et de m'avoir fait participer à leurs recherches. Je remercie les étudiantes de son laboratoire d'avoir eu la gentillesse de me servir de guide dans les rues de Naples. Je voudrais aussi remercier Fabienne PEYROT de m'avoir initié à un tout nouveau domaine de recherche et à une nouvelle technique. J'espère que notre collaboration nous permettra d'aboutir à des résultats intéressants. Merci à Caroline « Carrie » ALBERTIN et Annabelle AISH pour leur aide dans le maniement de la langue anglaise à la fois orale et écrite.

Je souhaite également exprimer tous mes remerciements à la partie de l'équipe située rue Cuvier. Sylvie D. merci pour ton soutien, ta disponibilité, ton intérêt pour mon travail et tes bons conseils. Merci à Sylvie B., Françoise, Karine, Marina, Gersende, Delphine pour votre bonne humeur et votre convivialité lors de nos points manips. Je voudrais remercier tout particulièrement Jérémy et Anne-Gaëlle pour leur aide dans l'analyse de mes séquences et la manipulation des divers logiciels et site web d'analyse. Merci de m'avoir aidé à y voir plus clair. Merci aussi à Cécile avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à discuter, échanger, confronter nos protocoles d'hybridation *in situ*. Et merci à Salima avec qui j'ai travaillé, échangé et toujours dans la bonne humeur. Merci à vous quatre d'avoir fait évoluer ces échanges professionnels en échanges amicaux.

Merci à tous les étudiants qui se sont succédés pour partager le quotidien de la vie du Labo. Je pense à Angélique, Arthur, Baptiste, Coralie, Guillaume, Lidvine et Louis. Un merci particulier à Leslie, Mellissandre, Martin qui m'ont accompagné et aidé dans l'exploration de mon sujet d'étude. Je pense aussi à Auxane, nous avons traversé ses années de thèse ensemble, ainsi que la phase délicate de la rédaction du manuscrit. Merci pour les moments de détente et pour la découverte de fruits exotiques et diverses spécialités asiatiques.

La liste est trop longue pour les citer tous, mais ils se reconnaîtront, qu'ils sachent que je ne les oublie pas, merci d'avoir partagé avec moi les bon moments comme les plus difficiles. MERCI À VOUS TOUS.

---

# TABLES DES MATIÈRES

---

## INTRODUCTION

<b>Partie 1 : Les couleurs dans le monde animal</b>	<b>7</b>
1. Diversité de couleurs et de motifs chez les Métazoaires	<b>11</b>
2. Forces évolutives et diversité des motifs	11
2.1 Le camouflage et la sélection de survie	12
2.2 L'aposématisme et la sélection de survie	13
2.3 Le mimétisme et la sélection de survie	18
2.4 Des motifs ayant évolué par sélection sexuelle	19
3. Nature des couleurs chez les métazoaires	20
3.1 Les couleurs pigmentaires chez les métazoaires	21
3.2 Les couleurs structurelles chez les métazoaires	22
4. Développement, génétique et variabilité des motifs chez les métazoaires	25
4.1 Variations et variabilité des motifs colorés chez certains métazoaires	27
4.2 Localisation histologique des structures responsable des motifs colorés	27
4.3 Développement et génétique des motifs colorés	30
	30
<b>Partie 2 : Couleurs et motifs chez les céphalopodes</b>	
1. Le groupe des céphalopodes	<b>33</b>
2. Des structures tégumentaires colorées spécifiques	33
2.1 Les chromatophores	35
2.2 Les leucophores	36
2.3 Les iridophores	37
3. Diversité des ornements chez les Coléoïdes	37
3.1 Les octopodiformes	39
3.2 Les Loliginidés	39
3.3 Les Sepiidés	41
4. Motifs corporels colorés et dynamiques	42
4.1 Le camouflage	43
4.2 L'aposématisme et le mimétisme	43
4.3 La communication	47
5. Contrôle et dynamique des changements colorés	48
5.1 Un contrôle essentiellement nerveux	51
5.2 Le réseau du contrôle nerveux des chromatophores	51
5.3 Les neurotransmetteurs impliqués dans le contrôle des chromatophores	53
	54
<b>Problématique générale de la thèse</b>	
	<b>55</b>

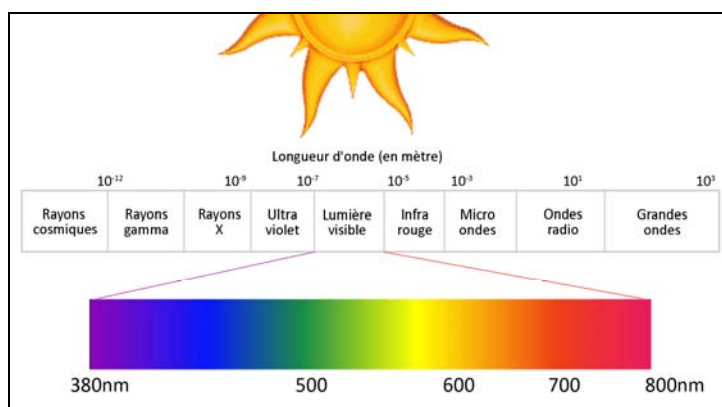
<b>METHODOLOGIE : Modèle d'étude et Méthodologies employées</b>	<b>59</b>
1. Le matériel biologique	59
1.1 Le modèle d'étude : la seiche	59
1.2 Origine des embryons et des tissus adultes employés et modes de fixation	60
1.3 Extraction d'ADN et ARN, synthèse d'ADNc et RACE-PCR	61
1.4 Coupe au cryostat	62
2. Le clonage des gènes d'intérêt	62
3. L'analyse phylogénétique	62
4. Les hybridations <i>in situ</i>	63
4.1 Synthèse des sondes ARN	63
4.2 Hybridation <i>in situ</i> simple avec révélation au NBT-BCIP	63
4.3 Hybridation <i>in situ</i> simple avec révélation fluorescente	64
4.4 Hybridation <i>in situ</i> double avec révélation fluorescente sur coupes	64
5. Expérimentation sur embryons vivants	65
6. Immunomarquage	65
7. Coupes semi-fines	66
8. Observation et imagerie	66
<b>RESULTATS</b>	
<b>Partie 1 : Etude des chromatophores chez <i>S. officinalis</i> : aspects développementaux et génétiques</b>	<b>69</b>
1.1 La dynamique d'apparition des pigments des chromatophores dans l'embryon	70
1.2 La recherche des mécanismes de distribution du réseau des chromatophores	81
1.3 La recherche de la nature des pigments des chromatophores	86
1.4 La recherche de marqueurs moléculaire des chromatophores en développement	93
<b>Partie 2 : Etude des iridophores chez <i>S. officinalis</i> : aspects développementaux, génétiques et évolutifs</b>	<b>99</b>
2.1 L'apparition de l'iridescence dans l'embryon de <i>S. officinalis</i>	100
2.2 Recherche et caractérisation des différents gènes de réflectine chez <i>S. officinalis</i>	105
2.3 La dynamique de développement des iridophores chez <i>S. officinalis</i>	109
2.4 Recherche de spécificités développementales des six gènes de réflectine	114
2.5 Phylogénie de la famille des réflectines chez les céphalopodes : une histoire évolutive complexe	120
<b>PERSPECTIVES EVOLUTIVES et DISCUSSIONS</b>	<b>129</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>137</b>
<b>ARTICLES</b>	<b>153</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>219</b>

# **INTRODUCTION**

De l'art pariétal aux parures amazoniennes à base de plumes colorées ou d'écaillés, des mosaïques romaines à la peinture naturaliste flamande, les différentes cultures humaines ont toujours été fascinées par les motifs colorés des animaux et ont souvent cherché à les utiliser ou à les reproduire le plus fidèlement possible. Leurs tonalités, leurs nuances, leurs effets lumineux mais aussi leur composition et leur fragilité sont autant d'énigmes et d'objets de curiosité.

Si l'étude physique de la couleur débute au 17<sup>ème</sup> siècle avec Newton, l'étude scientifique de la couleur en biologie est par contre plus récente et commence vraisemblablement avec l'isolement de la molécule de chlorophylle en 1816 par Joseph Bienaimé Caventou et Joseph Pelletier. Ce champ d'étude est encore à l'heure actuelle largement exploré et recouvre différentes approches : des approches chimiques (pour décrypter la nature des couleurs), des approches cellulaires et histologiques (pour localiser les tissus et organes impliqués), des approches développementales et physiologiques (pour comprendre leur mise en place et leurs variations), des approches évolutives (pour expliquer la diversité des couleurs) et des approches écologiques (pour comprendre leurs fonctions). Mon travail de thèse, chez la seiche (*Sepia officinalis*), s'inscrit exactement dans cette diversité d'approches, en se focalisant plus particulièrement sur les aspects développementaux des structures colorées existantes chez ce céphalopode.

La couleur est un phénomène physiologique. La couleur que l'on perçoit d'un objet est de la lumière, c'est-à-dire un ensemble d'ondes électromagnétiques visibles par notre œil (longueurs d'onde comprises entre 380 nm (violet) et 800 nm (rouge)) ou non visibles (infrarouge et ultraviolet par exemple ; **Fig. 1**). Ainsi, c'est en s'intéressant à la lumière blanche, en la réfractant et en la décomposant à l'aide de prismes, qu'Isaac Newton décrypta la nature chromatique de la lumière blanche et inaugura la colorimétrie moderne.

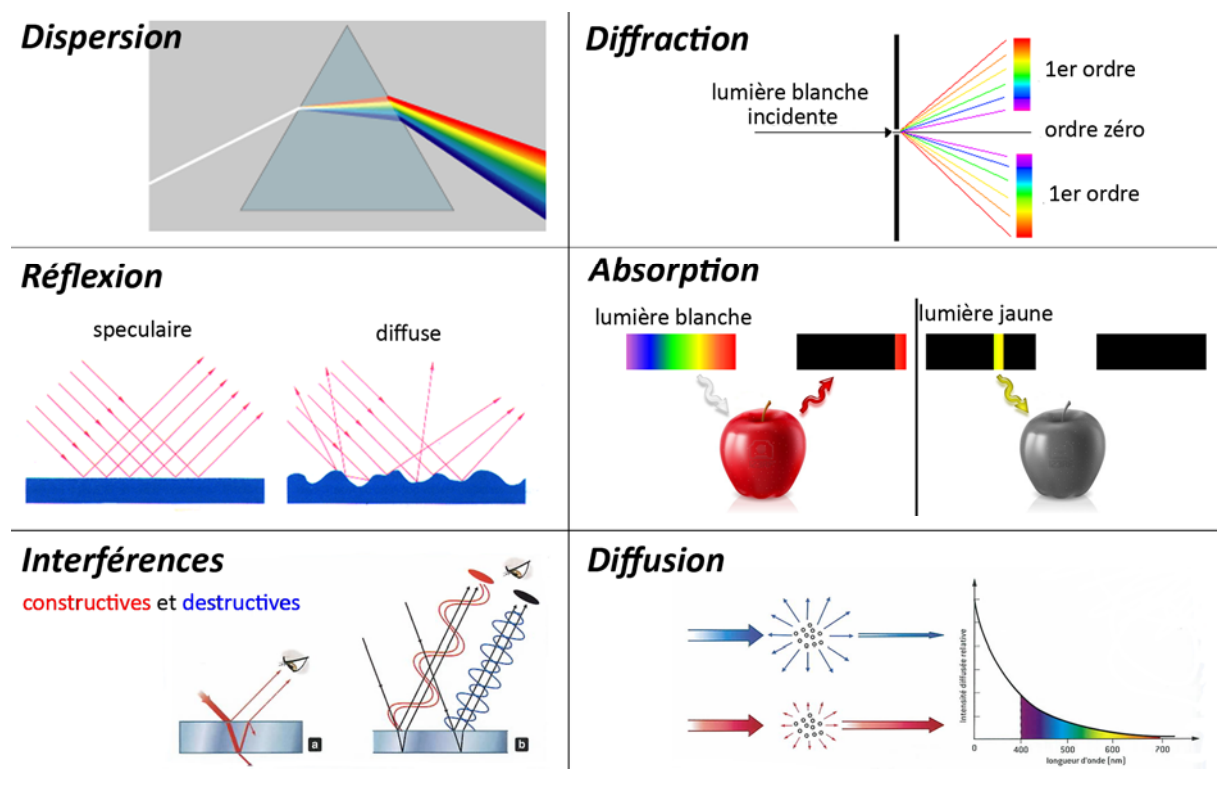


**Figure 1.**  
**Rayonnement électromagnétique et spectre visible.** L'ultraviolet et l'infrarouge ne sont pas visibles. Les couleurs habituellement répertoriées sont : violet (380-450nm), bleu (450-490nm), vert (490-560nm), jaune (560-590nm), orange (590-630nm), rouge (630-800nm). La variation de teinte est continue et cette distinction est totalement arbitraire.

La couleur d'un objet peut tout d'abord être le résultat direct d'une production de lumière par cet objet lui-même. On parle dans ce cas de source primaire de lumière (donc de couleur). Deux phénomènes permettent la production primaire de lumière : l'incandescence correspond à une émission de lumière due à la chaleur (flamme d'une bougie, métal en fusion, Soleil), la luminescence,

qui elle, correspond à la capacité de certains corps à émettre des photons sans changement de température (diodes électroluminescentes, tubes fluorescents, écran cathodique). Dans le monde vivant, seule la bioluminescence permet à certains organismes aquatiques ou terrestres d'être des sources primaires de lumière.

Un objet peut également être une source secondaire de lumière. La couleur qu'il émet est le résultat d'interactions multiples entre le spectre de la lumière qui l'éclaire et sa matière (diffusion, diffraction, interférences, absorption ; **Fig. 2**). Ainsi si un objet éclairé par de la lumière blanche nous apparaît rouge c'est parce qu'il absorbe toutes les longueurs d'ondes qu'il reçoit à l'exception des ondes électromagnétiques de longueur d'onde comprise entre 620 et 800 nm qu'il renvoie et que l'on perçoit. Ce même objet, si on l'éclaire par de la lumière jaune, deviendra noir dans la mesure où toutes les ondes qu'il reçoit seront absorbées.

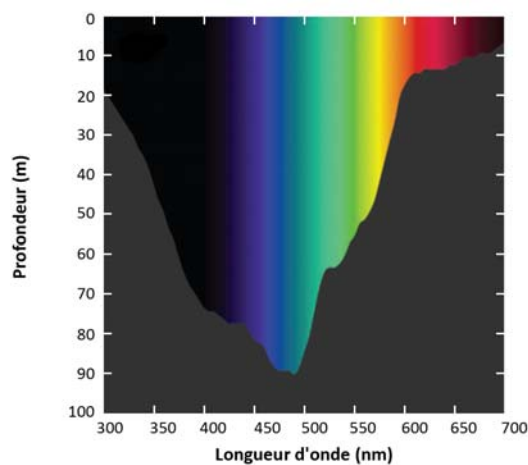


**Figure 2. Illustrations des interactions possibles entre le spectre de la lumière blanche et un objet.** **Dispersion**, la décomposition de la lumière blanche est due à la déviation des rayons lumineux la composant en fonction de leur longueur d'onde ; ©licence GFDL. **Diffraction**, lorsque les ondes composant la lumière rencontre un objet, les ondes subissent un changement de direction par propagation ; ©yey.be/gemologyOnline.com. **Réflexion**, quand l'objet est poli, il renvoie la lumière avec un angle de réflexion égale à l'angle d'incidence (spéculaire), dans le cas d'une surface rugueuse, la lumière est réémise dans toutes les directions (diffuse) ; ©Benoit Marsat. **Absorption**, un objet apparaît rouge lorsqu'il est éclairé par une lumière blanche dont toutes les longueurs d'onde sont absorbées sauf le rouge. Le même objet apparaît noir s'il est éclairé par une lumière jaune car les ondes sont complètement absorbées ; d'après yey.be/gemologyOnline.com. **Interférences**, (a) l'épaisseur des traits rouges est proportionnelle à l'intensité ; (b) dans une direction donnée et pour une épaisseur donnée, les interférences sont constructives (se renforcent) pour une certaine longueur d'onde (en rouge) et destructives (s'annihilent) pour une autre longueur d'onde (en bleu), en modifiant l'angle d'incidence ou en changeant l'épaisseur de la lame, on



observera des interférences constructives et destructives à d'autres longueurs d'onde (Valeur, 2005, 2011). **Diffusion** de la lumière blanche par un ensemble de particules plus petites que le dixième de la longueur d'onde est d'autant plus efficace que la longueur d'onde est petite (Valeur, 2005).

En conclusion, retenons que la couleur d'un objet n'est pas seulement la conséquence de ses propriétés intrinsèques (liées à sa matière) mais dépend également de la qualité de la lumière qui l'éclaire. Ce point est important en biologie, dans la mesure où le milieu de vie des organismes (aérien ou aquatique) peut modifier très nettement la qualité de la lumière incidente (issue du soleil). Ainsi, en milieux aquatiques, la qualité du spectre lumineux décroît rapidement avec la profondeur, puisque l'eau diffuse les longueurs d'ondes mais en absorbe aussi beaucoup (Mobley, 1994). Précisément, les longueurs d'onde supérieures à environ 500 nm (vert, jaune, orange, et rouge) sont rapidement absorbées plus qu'elles ne sont diffusées. Les longueurs d'onde inférieures à environ 500 nm (bleu, violet, et la lumière UV), sont, quand à elles, diffusées plus profondément avant d'être finalement totalement absorbées (principalement par l'eau, le phytoplancton et les particules ; **Fig. 3**). Avec la profondeur, même les eaux claires deviennent donc rapidement sombres et monochromes. A 850 m, il n'y a plus de lumière visible (pour l'homme), et à 1000 m, c'est l'obscurité totale même pour les animaux ayant les yeux les plus sensibles (Warrant & Locket, 2004).



**Figure 3. Diminution de la qualité du spectre lumineux en fonction de la profondeur d'après Johnsen, 2013.** Les longueurs d'onde supérieures à environ 580 nm (jaune, orange et rouge) sont absorbées rapidement, pour atteindre, à une profondeur de 10 m environ, moins de 1% de leurs valeurs en surface. L'atténuation de la lumière violette et verte se fait aux niveaux intermédiaires, pour atteindre 1% de leurs valeurs de surface à une profondeur d'environ 50 m. La lumière bleu-verte avec une longueur d'onde de 480 nm est atténuée la dernière, car elle atteint 1% de sa valeur en surface à environ 100 m, puis chute d'environ 40 à 50 fois pour chaque tranche additionnelle de 100 m.

Avant d'aborder ma problématique sur la mise en place des structures et motifs colorés chez *Sepia officinalis*, j'ai souhaité faire une présentation, nécessairement synthétique et partielle, des données actuelles sur cette thématique très large. J'ai scindé cette introduction en deux parties. Dans une première partie, je présenterai les données concernant les principaux champs d'études -passés et actuels- sur les couleurs chez les Métazoaires: la diversité des motifs, leurs fonctions, les aspects biochimiques et cellulaires liés à la synthèse des couleurs, les aspects développementaux de la mise en place des motifs. Dans une seconde partie, je présenterai les données spécifiques aux céphalopodes en précisant en particulier les aspects moins connus sur lesquels mon travail de thèse a cherché à apporter de nouvelles données.

---

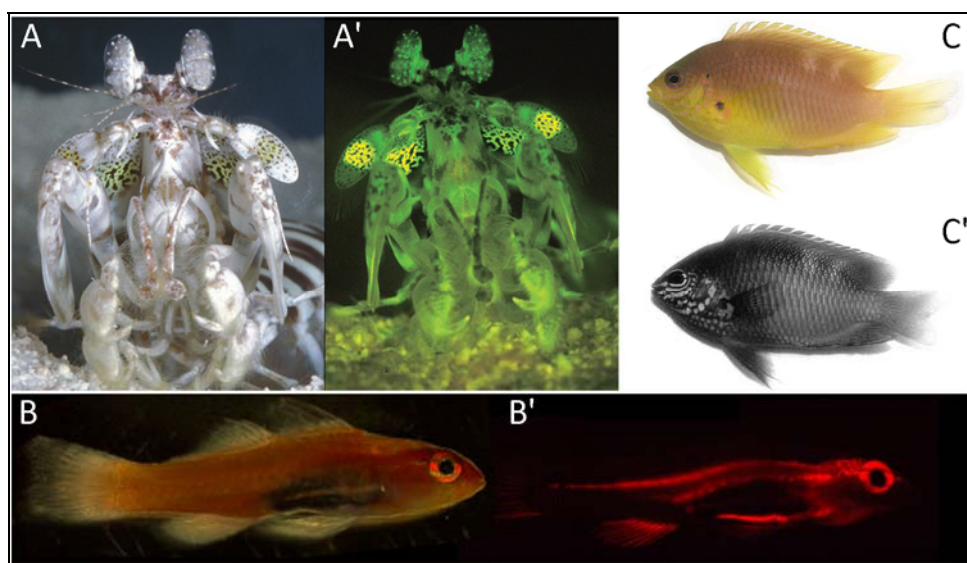
# Partie 1

## Les couleurs dans le monde animal

---

### 1. Diversité de couleurs et de motifs chez les Métazoaires

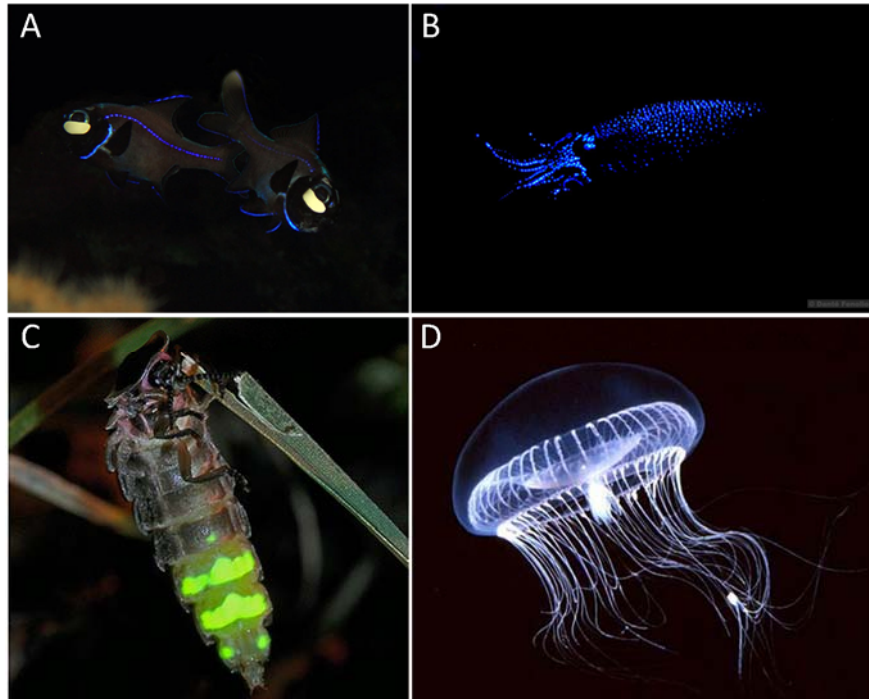
Presque toutes les couleurs du spectre lumineux existent au sein des métazoaires terrestres ou aquatiques. La majorité des couleurs émises par les organismes sont produites par une modification du spectre lumineux (absorption-réflexion) : le bleu, le jaune, le rouge, le vert, mais également des longueurs d'ondes au-delà du spectre du visible (Siebeck, 2004 ; Whiting *et al.*, 2006 ; Siebeck *et al.*, 2010). Certains animaux peuvent être fluorescents : certaines longueurs d'ondes reçues sont absorbées par des molécules, qui, alors excitées, réémettent une lumière à une longueur d'onde différente. C'est le cas des Crustacés de l'ordre des Stomatopoda (Mazel *et al.*, 2004) ou de certains Gobiidae tels que *Eviota pellucida* (Michiels *et al.*, 2008 ; Fig. 4).



**Figure 4. Exemples de motifs fluorescents et UV chez certains Métazoaires.** A-A', *Lysiosquilla glabriuscula* (Crustacés, Stomatopoda) en lumière blanche (A) et en lumière bleue (A'). La lumière bleue est filtrée dans la deuxième image afin de mieux montrer la fluorescence verte et jaune sur l'animal (Mazel *et al.*, 2004). B-B', *Eviota pellucida* (Gobiidae) en lumière blanche (B) et fluorescence rouge visible en lumière bleue (B') (Michiels *et al.*, 2008). C-C', *Pomacentrus amboinensis* (Pomacentridae) vu par le système visuel humain (C) et prise de vue avec des filtres UV (C'). Les zones blanches reflètent les UV et les zones sombres absorbent la lumière UV (Siebeck, 2004).

Enfin, certains organismes, essentiellement marins et planctoniques, sont des sources primaires de lumière : sans même recevoir la moindre lumière extérieure, ils peuvent produire de la lumière et donc de la couleur (bioluminescence) (Wilson & Hasting, 1998). On rencontre ce phénomène chez les Protozoaires (Radiolaires), les Cnidaires (méduses, Siphonophores), chez les

Mollusques (en particulier les calmars) et chez les Vertébrés (essentiellement des poissons) (**Fig. 5**). On trouve enfin chez les Arthropodes, l'exemple le plus connu d'organisme bioluminescent avec le Coléoptère *Lampyris noctiluca* (vers luisant ; **Fig. 5C**).



**Figure 5. Exemples de Métazoaires bioluminescents (sources primaires de lumière).** A, Anomalopidés *Photoblepharon steinitz* (©Dray van Beeck & Karin van Beeck-Swanepoel). B, céphalopode *Watasenia scintillans* (©Danté Fenolio). C, Coléoptère *Lampyris noctiluca* (©Christophe Quintin). D, Leptothecates *Aequarea victoria* (©Kevin A Raskoff)

## 2. Forces évolutives et diversité des motifs

Les organismes peuvent présenter une coloration uniforme de leur corps ou bien présenter ce que l'on appelle des « motifs », c'est-à-dire des figures colorées composées d'au moins deux couleurs. Une grande diversité de motifs colorés existe chez les organismes terrestres comme des bandes, des taches ou des ocelles, en noir et blanc ou en couleur, et ces mêmes motifs se retrouvent chez les organismes aquatiques. La production et le maintien de motifs colorés pour un organisme (les cellules, les pigments et les structures associées) représentent un coût énergétique. L'évolution des motifs colorés s'explique donc nécessairement en termes d'avantages adaptatifs qui permettent à leur « porteur » d'augmenter leur succès reproducteur, c'est-à-dire leurs chances de transmettre leurs gènes à la génération suivante. Cela signifie par exemple mieux se nourrir, mieux se défendre, se reproduire plus souvent, avoir plus de descendants : c'est le principe de la sélection naturelle (Darwin, 1859). La sélection naturelle s'appuie sur deux mécanismes conjoints. Le premier est la sélection de survie, elle repose sur l'idée que pour pouvoir se reproduire, il faut d'abord survivre, et le second est

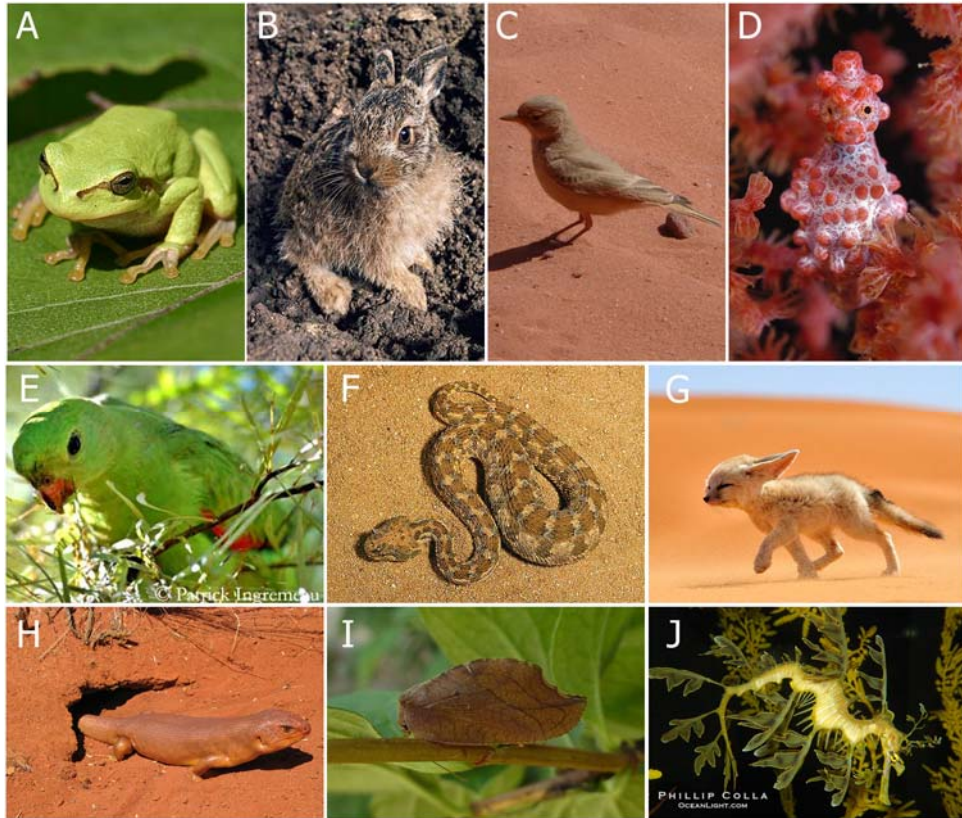
la sélection sexuelle, elle repose sur une compétition au sein de chaque espèce pour accéder aux partenaires sexuels dans le cadre de la reproduction sexuée (Davies *et al.*, 2012). Les motifs de couleurs et leurs variations adaptatives chez les animaux peuvent être expliqués par ces deux forces évolutives et c'est en les classant par leur « fonction » que j'illustrerai ici la diversité des motifs des Métazoaires.

## 2.1 Le camouflage et la sélection de survie

On parle de camouflage lorsqu'un animal, par sa couleur et/ou sa forme, se confond avec des éléments de son environnement (une feuille, un rocher, une écorce,...). L'évolution du camouflage relève de la sélection de survie, et plus précisément des relations proies-prédateurs. En effet, le camouflage, en jouant sur la capacité de détection et de discrimination vis-à-vis de l'environnement, peut soit diminuer la pression de prédation (dans le cas d'une proie) soit augmenter les chances de prédation (dans le cas d'un prédateur). L'exemple le plus célèbre est celui de l'évolution des populations britanniques de *Biston betularia* (phalène du bouleau ; Kettlewell, 1961). Les changements de couleurs des troncs de bouleau dus à la pollution industrielle ont provoqué des changements de pression sélective sur les morphotypes « ailes blanches » et « ailes noires » de ces papillons, ce qui a abouti à une modification dans la population des fréquences alléliques des gènes responsables de ces morphotypes. Différentes stratégies de camouflage ont été sélectionnées, souvent par le biais d'une ressemblance générale avec l'environnement, ou d'une coloration perturbatrice grâce à des contrastes élevés, ou encore à l'ombre inversée. En milieu aquatique, les principales méthodes de camouflage sont la transparence, l'argenture et l'ombre inversée ou le contre-éclairage, certains organismes ayant la capacité de produire de la lumière (grâce à la bioluminescence ; Wilson & Hasting, 1998 ; Widder, 2010).

### a) Ressemblance avec l'environnement (homochromie)

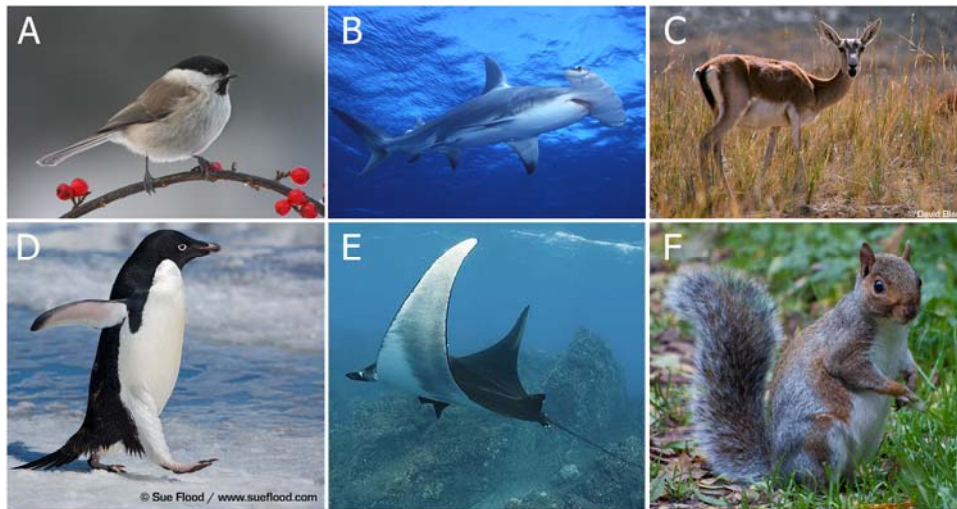
Les couleurs et motifs très fréquemment sélectionnés sont ceux qui permettent aux organismes de se dissimuler dans leur niche écologique et d'être moins visibles de leur prédateurs ou de leurs proies (homochromie) (Cott, 1940 ; Fig. 6). Dans un même écosystème, cette force évolutive a souvent conduit à des convergences colorées entre taxons comme c'est le cas pour les animaux du désert (présentant des tons sable, chamois, ocre ou gris brunâtre) (Fig. 6F, G, C, H) et pour les animaux de la savane (présentant des tons fauves). Dans certains cas, ce type de camouflage peut être associé à une morphologie particulière de l'animal (homotypie) qui le confond visuellement avec certains éléments de l'environnement. Par exemple, le *Drepanopteryx phalenoïdes* (Hémérobe, Fig. 6I) ressemble parfaitement à une feuille morte. De même, certains hippocampes ont le corps qui ressemble fortement à des coraux, comme *Hippocampus bargibanti* (hippocampe pygmée, Fig. 6D), ou à des algues, comme *Phycodurus eques* (hippocampe feuille, Fig. 6J).



**Figure 6. Illustration du camouflage en fonction de l'habitat de quelques métazoaires terrestres et aquatiques. A,** Hylidé *Hyla arborea* (©Christoph Leeb). **B,** Leporidé *Lepus europaeus* (©gettyimages.com). **C,** Alaudidé *Ammomanes deserti* (©Alastair Rae). **D,** Syngnathidé *Hippocampus bargibanti* (©Vickie Coker). **E,** Psittacidés *Aprosmictus erythropterus* (©Patrick Ingremeau). **F,** Viperidé *Cerastes cerastes* (©Jan Sevcik). **G,** Canidé *Vulpes zerda* (©Francisco Mingorance). **H,** Scincidé *Liopholis kintorei* (©Adam Stow). **I,** Neuroptère *Drepanopteryx phalaenoides* (©Yannick Mourgues). **J,** Syngnathidé *Phycodurus eques* (©Phillip Colla).

#### *b) Ombre inversée et contre-illumination*

Souvent la couleur d'un organisme est différente entre sa face dorsale et sa face ventrale (**Fig. 7**) et c'est la face portant une ombre (généralement la face ventrale) qui est la plus claire des deux. Ce phénomène qualifié d'ombre inversée s'explique par l'importance qu'a l'ombre d'un corps dans l'appréciation de sa forme et de son volume. Si la partie située dans l'ombre est blanche, alors que la partie éclairée est colorée, l'objet semble plus plat et moins visible, ce principe est appelé loi de Thayer (Forbes, 2009). L'ombre inversée est utilisée par les animaux terrestres tels que les oiseaux mais aussi par les animaux marins tels que *Sphyrna mokarran* (requin marteau, **Fig. 7B**), *Manta birostris* (raie, **Fig. 7E**), et certains céphalopodes (Ruxton *et al.*, 2004). Un second principe a été également avancé pour expliquer l'ombre inversée. Certains animaux occupent une position plus exposée dans leur milieu. Ils présentent des couleurs qui leur permettent de se confondre non pas avec leur milieu proprement dit, mais avec le « fond » ou l'horizon sur lequel ils risquent de se découper. Ce principe consiste à envoyer aux récepteurs potentiels (prédateurs ou proies) un signal similaire à la tonalité du fond se trouvant derrière l'animal (Rowland, 2009).



**Figure 7. Illustration de l'ombre inversée chez quelques métazoaires terrestres et aquatiques. A, Paridé *Parus montanus* (©Jürgen Liebner). B, Sphyrnidé *Sphyrna mokarran* (©Simon Rogerson). C, Bovidé *Gazella subgutturosa* (©David Blank). D, Sphéniscidé *Pygoscelis adeliae* (©Sue Flood). E, Myliobatidé *Manta birostris* (©Richard Herrmann). F, Sciuridés *Sciurus carolinensis* (©Colin Knight).**

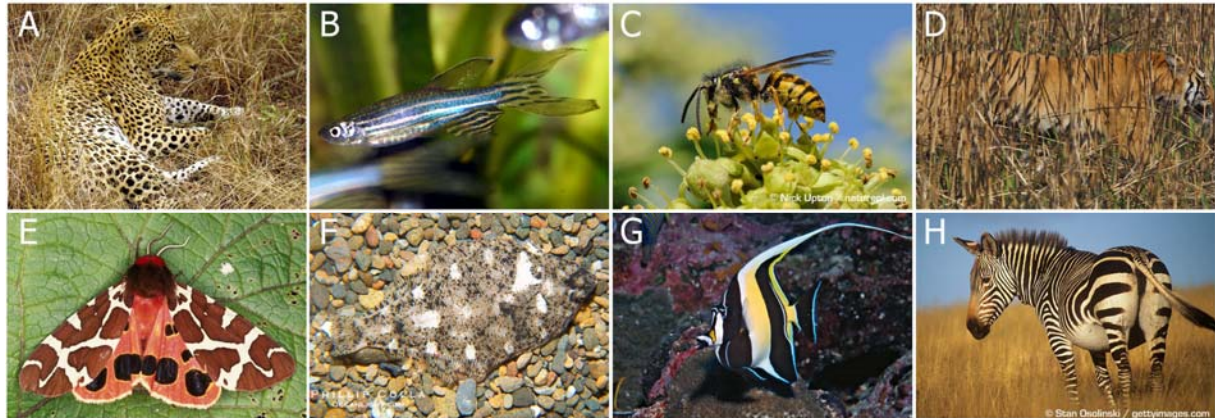
Ce même principe peut être appliqué à la contre-illumination, lorsque l'organisme produit une lumière qui lui permet de correspondre à un fond qui est plus lumineux que lui. C'est une des fonctions de la bioluminescence de certains poissons : en émettant une lumière ventrale, ils se confondent avec la luminosité du ciel, et passent inaperçus auprès des prédateurs situés en dessous d'eux dans la colonne d'eau (Jones & Nishiguchi, 2004).

### c) Coloration disruptive

La coloration disruptive consiste à rompre l'unité visuelle du corps et sa symétrie (Cott, 1940). En effet, les contours réguliers d'un animal, sa symétrie bilatérale et sa forme équilibrée, homogène, ne s'accordent pas toujours avec les irrégularités de l'environnement et des différents supports (écorces, rochers, sol...). Deux types de motifs permettent de contrer ces caractéristiques des organismes :

- des taches irrégulières et disposées sans ordre, aux contours bien définis (sombres sur fond clair...), rendent à une certaine distance la forme globale du corps moins perceptible comme par exemple chez *Panthera pardus* (léopard, Fig. 8A). Leur efficacité peut encore être renforcée quand des taches de couleurs vives se mêlent à ces motifs irréguliers, car elles attirent l'œil de l'observateur qui néglige alors la forme générale de l'animal (Stevens *et al.*, 2006).
- une alternance de bandes ou rayures contrastées, alternant le clair et le sombre ; dans la pénombre (sous-bois...), seules les rayures claires sont bien perçues, mais ne trahissent pas la forme du corps, à

l'inverse dans un environnement lumineux ce sont les parties claires qui se confondent avec le milieu. De telles zébrures sont portées par des centaines d'espèces de poissons (comme le poisson zèbre *Danio rerio*, **Fig. 8B**), de nombreux insectes Hyménoptères (**Fig. 8C**) et des mammifères (Ruxton *et al.*, 2004 ; Stevens & Merilaita, 2009 ; **Fig. 8D, H**).



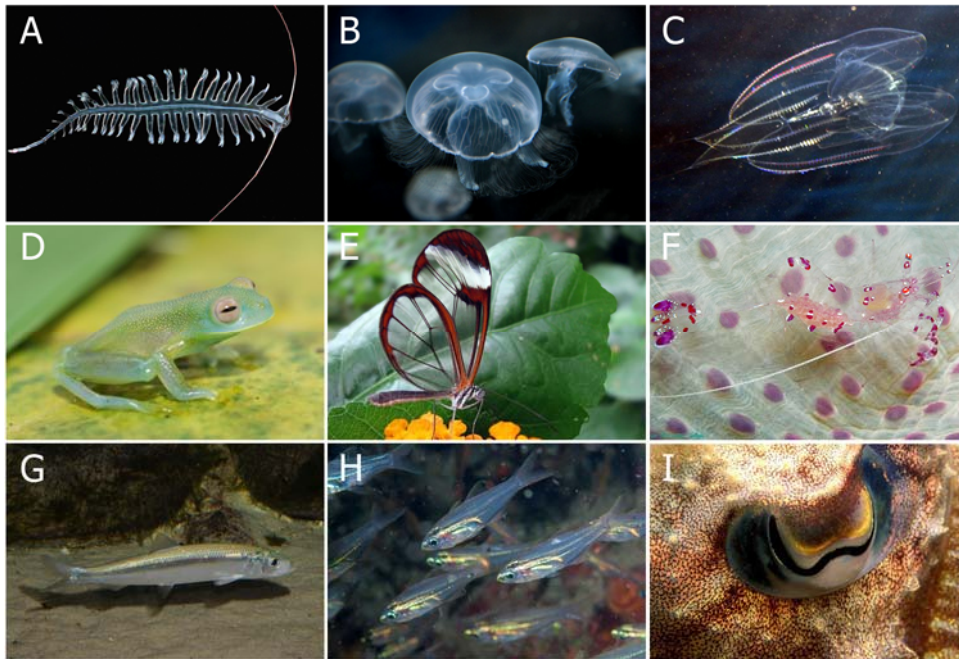
**Figure 8. Exemples de motifs disruptifs chez quelques métazoaires terrestres et aquatiques. A**, Félinid *Panthera pardus* (©Lukas Kaffer) ; **B**, Cyprinid *Danio rerio* (©Marrabio2) ; **C**, Hyménoptère *Vespula vulgaris* (©Nick Upton) ; **D**, Félinid *Panthera tigris* (©Steve Winter) ; **E**, Lépidoptère *Arctia caja* (©Malcolm Storey) ; **F**, Pleuronectiforme *Citharichthys sp* (©Phillip Colla) ; **G**, Perciforme *Zanclus cornutus* (©Toby D Tomlin) ; **H**, Equid *Equus zebra* (©Stan Osolinski).

A l'inverse, toute zébrure ne s'explique pas forcément en regard de l'environnement et d'un possible camouflage même disruptif. Ainsi les zébrures noires et blanches du zèbre (**Fig. 8H**) ne correspondent pas aux couleurs de la savane et ont longtemps intrigué les scientifiques. Il a été démontré récemment que ce motif fonctionne comme répulsif contre les mouches parasites du zèbre (Egri *et al.*, 2012).

#### *d) transparence et argenture*

En milieu aquatique, de nombreux organismes présentent une transparence presque parfaite de leur corps et passent inaperçus dans la colonne d'eau (Herring, 2002). Leurs tissus, composés pour majorité d'eau, présentent un indice de réfraction proche de celui de l'eau de mer et ne modifient que très peu la diffusion de la lumière (McFall-Ngai, 1990). De nombreuses espèces aquatiques présentent ce type de camouflage, comme *Tomopteris sp.* (Annélide, **Fig. 9A**), *Aurelia aurita* (Cnidaire, **Fig. 9B**), *Eurhamphaea vexilligera* (Cténophore, **Fig. 9C**) et de nombreux céphalopodes (Johnsen, 2001). Quelques espèces terrestres peuvent présenter une certaine transparence mais celle-ci n'est souvent localisée que sur une partie du corps de l'animal, comme sur la partie ventrale de *Cochranella*

*granulosa* (Anoure, **Fig. 9D**) ou une partie des ailes de *Greta oto* (Lepidoptère, **Fig. 9E**) (Johnsen, 2001).



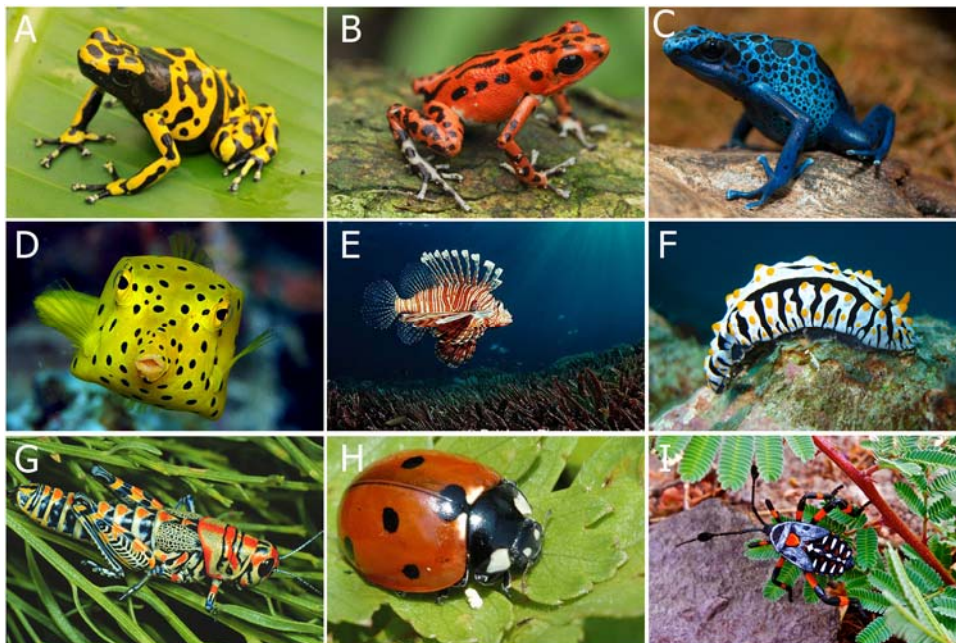
**Figure 9. Illustration de la transparence et de l'argenture chez quelques métazoaires terrestres et aquatiques. A-F, illustration de la transparence. G-I, illustration de l'argenture. A, Polychète *Tomopteris helgolandica* (©F Pleijel) ; B, Schyphozoaire *Aurelia aurita* (©Adam Hake); C, Cténaire *Eurhamphaea vexilligera* (©Grégoery Dallavalle) ; D, Anoure *Cochranella granulosa* (©Justin Touchon) ; E, Nymphalidé *Greta Oto* (©Kelebek Resimlari) ; F, Décapode *Periclimenes holthuisi* (©Jeffrey N. Jeffords) ; G, Clupéiforme *Clupea harengus* (©N. Sloth) ; H, Perciforme *Rhabdamia gracilis* (©Massimo Boyer) ; I, œil du céphalopode *Sepia officinalis* (©Vincent Maran).**

Quand la transparence ne peut pas être atteinte, un autre mécanisme permet aux organismes de passer inaperçus appelé l'argenture qui a pour principe de rendre tout ou partie du corps de l'animal hautement réfléchissante (Denton & Land, 1971 ; Marshall & Johnsen, 2011). A des profondeurs moyennes dans l'océan, la lumière arrive par le haut, de sorte qu'un miroir orienté verticalement rend certains poissons quasiment invisibles en vue latérale (Johnsen, 2013). La plupart des poissons pélagiques comme *Sardina pilchardus* (sardine) et *Clupea harengus* (hareng, **Fig. 9G**) sont camouflés totalement par l'argenture, d'autres espèces comme *Rhabdamia gracilis* (poisson corallien, **Fig. 9H**) camouflent leurs viscères par ce procédé et les céphalopodes comme *Sepia officinalis* (seiche, **Fig. 9I**) qui camouflent leurs yeux (Marshall & Johnsen, 2011 ; Mäthger *et al.*, 2009a).



## 2.2 L'aposématisme et la sélection de survie

L'aposématisme est une stratégie de défense qui consiste pour un organisme à mettre en garde, par un signal avertisseur (visuel, sonore ou chimique), les éventuels prédateurs de leur dangerosité ou de leur toxicité (Ruxton *et al.*, 2004). L'efficacité de ce type de défense dépend donc de l'expérience du prédateur, s'il s'est déjà retrouvé face à un organisme de ce type et qu'il sait alors que le consommer peut s'avérer dangereux (Ruxton *et al.*, 2004). Les signaux aposématifs, lorsqu'ils sont visuels, sont constitués souvent de couleurs vives et contrastées (Fig. 10). Il a été démontré que les signaux d'alerte sont des indications honnêtes de toxicité des proies, ils sont corrélés avec la nocivité de l'organisme. Ainsi plus un organisme est visible, plus il est toxique (Maan & Cummings, 2012).

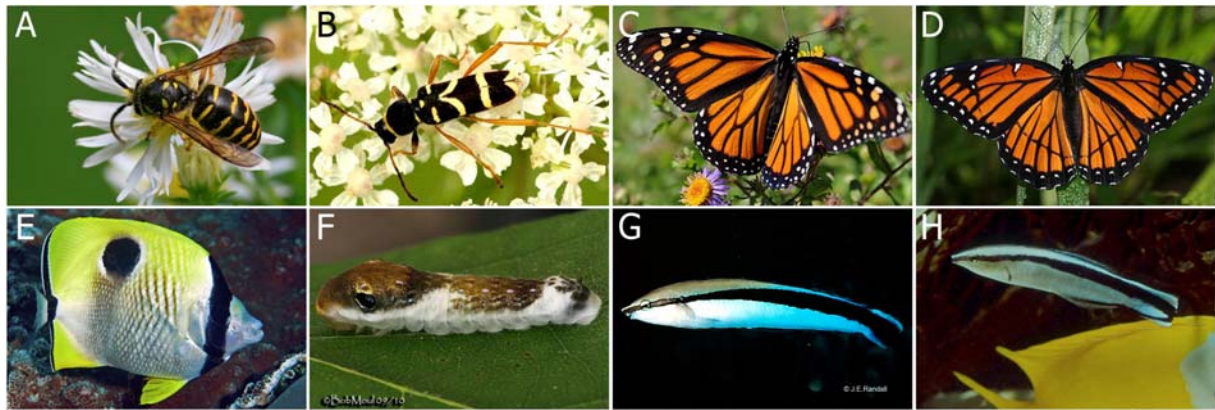


**Figure 10. Exemples de la diversité des signaux d'alerte (aposématifs) chez quelques métazoaires terrestres et aquatiques.** A, Anoure *Dendrobates leucomelas* (©Luis Alejandro Rodriguez J) ; B, Anoure *Oophaga pumilio* (©Thomas Marent); C, Anoure *Dendrobates azureus* (©Alex Bartok) ; D, Tetraodontiforme *Ostracion cubicus* (©Ken Knezick) ; E, Scorpaéniforme *Pterois volitans* (©Reinhard Dirscherl) ; F, Nudibranche *Phyllidia varicosa* (©Colin Knight) ; G, Orthoptère *Dactyloptum variegatum* (©Joseph Spencer) ; H, Coléoptère *Coccinella septempunctata* (©JK Lindsey) ; I, Hétéroptère *Thasus neocalifornicus* (©Mark Plonsky).

Les couleurs aposématifs les plus communes sont le rouge, le jaune et le noir (Stevens & Ruxton, 2012) : elles fournissent un contraste fort avec les couleurs de l'environnement et sont peu modifiées par les changements de lumière et d'ombre (Stevens & Ruxton, 2012). Une coloration d'avertissement est bien adaptée et est donc sélectionnée si elle répond aux différents critères que sont les couleurs et les conditions lumineuses de l'environnement, et la vision du prédateur (Wang & Shaffer, 2008).

### 2.3 Le mimétisme et la sélection de survie

Il y a mimétisme quand une espèce imite la forme, la couleur ou l'allure d'une autre espèce. Chez les Métazoaires, le mimétisme implique un mécanisme complexe de co-évolution mettant en jeu trois acteurs : (1) le modèle, émetteur de stimuli ou de signaux perceptibles par les sens, autrement dit l'espèce référence, (2) le mime, celui qui imite l'espèce référence et qui tire avantage de sa ressemblance avec le modèle et (3) la dupe<sup>1</sup>, bien souvent un prédateur, dont les sens (par exemple la vue dans le cas qui nous intéresse) perçoivent de la même manière les stimuli émis par le modèle et par le mime. On l'appelle aussi "opérateur" car la pression sélective s'exerce à travers lui : c'est l'acteur de l'évolution du mimétisme. Le mime ressemble au modèle et trompe la dupe. Le mimétisme est une stratégie adaptative d'imitation répandue dans le règne animal. Différentes formes de mimétisme existent:



**Figure 11. Exemples de mimétisme chez quelques métazoaires terrestres et aquatiques.** A-B, exemples de mimétisme Batésien. Des Hyménoptères nocifs tel que *Dolichovespula arenaria* (A, ©Michel Lamarche) servent de modèle à d'autres insectes inoffensifs comme par exemple *Clytus arietis* (B, ©JK Lindsey). C-D, exemples de mimétisme Müllérien. Deux espèces de Lépidoptères nocifs partages les même motifs colorés, comme *Danaus plexippus* (C, ©André Sarrasin) et *Limenitis archippus* (D, ©Jeffrey Pippen). E-F, exemples d'automimétisme. Présence de faux yeux pour dérouter le prédateur comme les ocelles de *Chaetodon Unimaculatus* (E, ©Francesco Ricciardi) ou les tâches sur la partie postérieure de la chenille de *Papilio troilus* (F, ©Bob Moul). G-H, exemples de mimétisme agressif. Des prédateurs comme *Aspidontus taeniatus* (G, ©JE Randall) utilisent cette technique : elle ressemble en tout point au *Labroides dimidiatus* (H, ©Heather Angel) qui se nourrit des parasites des autres poissons.

- **Le mimétisme dit défensif**, les plus connus étant le mimétisme Batésien et le mimétisme Müllérien, favorise la survie en améliorant les capacités de l'individu à échapper aux prédateurs. Dans le cas du mimétisme Batésien, une espèce inoffensive arbore l'apparence physique (motifs, couleurs, etc.) d'espèces nocives avec comme conséquence l'évitement des prédateurs qui ont appris à éviter les vraies espèces nocives (aposématiques ; Ricklefs, 2010 ; Norman *et al.*, 2001 ; Fig. 11A-B). Dans

<sup>1</sup> Oui, ce terme est bien féminin.

le cas du mimétisme Müllérien, et à la différence du mimétisme Batésien, les deux espèces sont nocives : il n'y a donc pas de duplicité, la ressemblance des couleurs d'avertissement reste avantageuse pour les deux espèces (Huheey, 1976 ; **Fig. 11C-D**). Ainsi une mauvaise expérience du prédateur avec une espèce protège toutes les autres espèces müllériennes (Ricklefs, 2010 ; Ritland & Brower, 1991). D'autres formes de mimétisme défensif existent, comme l'automimétisme : une partie du corps d'un organisme ressemble morphologiquement à une autre. Les tâches corporelles ressemblant à des yeux en sont un exemple (Neudecker, 1989 ; Stevens *et al.*, 2008 ; **Fig. 11E-F**).

- **Le mimétisme dit agressif** favorise la survie en augmentant les possibilités de l'individu à attraper des proies (Randall, 2005). Ce mimétisme agressif décrit des prédateurs partageant les mêmes caractéristiques que des espèces inoffensives (neutre ou bénéfique pour la dupe) leur permettant ainsi d'éviter la détection par leur proie (**Fig. 11G-H**).

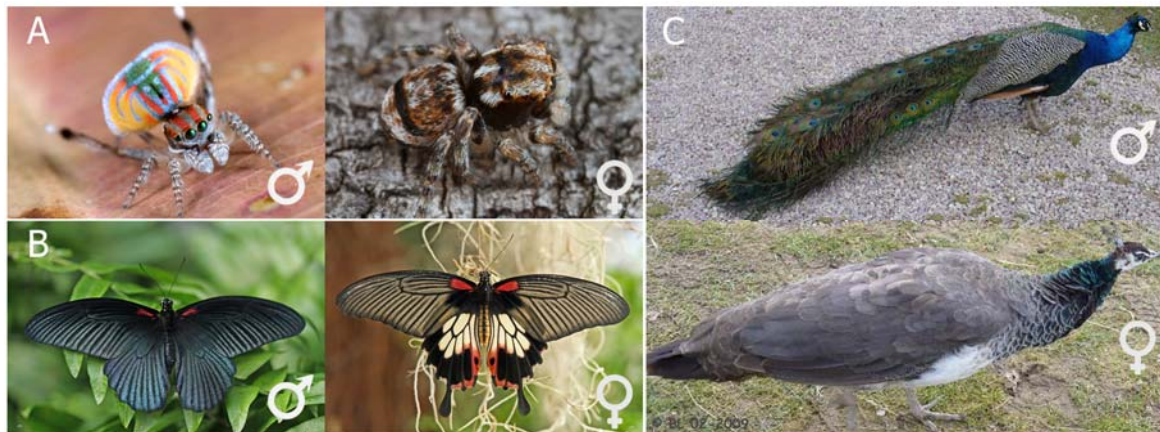
#### **2.4 Des motifs ayant évolué par sélection sexuelle**

Un très grand nombre de motifs colorés chez les Métazoaires ne trouvent pas d'explication si l'on ne considère que la seule sélection de survie. Par exemple, les plumes colorées du paon mâle constituent un signal visuel qui tendrait à attirer tout prédateur potentiel. Certains motifs vivement colorés de crustacés, de papillons ou de mollusques ne trouvent pas non plus d'interprétation en terme de camouflage ou de mimétisme (Searcy & Nowicki, 2009). En fait, l'existence de tels motifs colorés trouvent leur explication dans la sélection sexuelle (Andersson, 1994). Les mécanismes de la sélection sexuelle ont tendance à avantager des phénotypes qui vont à l'encontre de la sélection de survie (chants, couleurs ou tailles hors normes) mais qui ont une certaine efficacité auprès des partenaires sexuels ou des compétiteurs sexuels. En effet, pour la plupart des espèces animales, la production de gamètes par la femelle est coûteuse et l'accès au partenaire sexuel est un facteur important du succès de reproduction entre les individus (Eberhard, 1996). La compétition sexuelle peut donc prendre deux modalités non exclusives :

- une compétition en vue d'être le plus attirant pour les membres du sexe opposé, on parle de sélection intersexuelle.
- une compétition entre individus du même sexe pour s'arroger l'accès aux partenaires sexuels, on parle de sélection intrasexuelle.

Des études chez les oiseaux et d'autres organismes avec des polymorphismes de couleur montrent que la pigmentation peut influencer le choix du partenaire. Chez les pigeons sauvages, quel que soit le phénotype femelle, le phénotype mâle le plus recherché est celui des mâles qui produisent de la couleur bleue (Roulin, 2004). Chez les guppys, les femelles vont préférentiellement vers les mâles avec la couleur la plus orange. La comparaison de différentes populations a montré que cette préférence est d'autant plus forte que la coloration orange est commune chez les mâles (Houde & Endler, 1990). Ces préférences observées pour les phénotypes émetteurs de signaux fort et potentiellement dangereux en terme de survie peuvent être interprétés du point de vue de la sélection

sexuelle. La présence de ces signaux chez un individu peut être considérée, par les individus du sexe opposé, comme un signal honnête informatif d'un état de bonne santé (absence de maladie ou de parasites). En effet, les processus métaboliques aboutissant à la synthèse de pigments sont coûteux énergétiquement et leur réalisation constituerait un bon indicateur des capacités physiques du partenaire potentiel (Olson & Owens, 1998 ; Mautz *et al.*, 2013). Ces théories permettent ainsi d'expliquer le dimorphisme sexuel (Fig. 12) que l'on rencontre chez beaucoup d'espèces et qui souvent s'expriment au niveau des motifs colorés adoptés par les mâles ou les femelles (Andersson, 1994 ; Cox, 2010).



**Figure 12. Exemples de dimorphismes sexuels chez quelques métazoaires. A, Arachnide *Maratus volans* (©Jurgen Otto). B, Lepidoptère *Papilio memnon* (©Alain Maire). C, Phasianidé *Pavo cristatus* (©Bernard Langellier).**

### 3. Nature des couleurs chez les métazoaires

Au sein de la diversité des Métazoaires, on peut distinguer les couleurs selon la nature des structures qui les créent. Il peut souvent s'agir de cellules spécialisées. Ces cellules renferment dans leur cytoplasme des vésicules ou des structures microscopiques en forme de grains ou de lamelles. Ces cellules sont classées en sous-catégorie selon la teinte qu'elles produisent quand elles sont éclairées par de la lumière blanche: xanthophores (jaune), érythrophores (rouge), iridophores (réfléchissant/iridescent), leucophores (blanc), mélanophores (noir ou brun) et cyanophores (bleu). Mais il peut également s'agir d'éléments acellulaires. Des pigments colorés peuvent être présents au sein de couches non cellulaires, comme dans l'exosquelette chitineux des arthropodes, ou les couches de kératines des phanères des vertébrés. De même, certains animaux sont colorés parce que leur sang (ou hémolymphe) contient des pigments respiratoires. C'est le cas de la coloration rose de la peau humaine ou des salamandres blanches (Istenic & Ziegler, 1974) qui est due à la présence de l'hémoglobine dans les vaisseaux sanguins sous-jacents.

On trouve également dans la littérature une catégorisation des couleurs selon la nature de l'interaction mise en jeu avec la lumière. On distingue ainsi souvent les couleurs dites physiques des couleurs dites chimiques (Fox, 1976). Les couleurs sont dites physiques quand elles sont obtenues par des chocs « élastiques » entre la lumière et la matière, telles que, la dispersion, la diffusion, la diffraction et/ou des phénomènes d'interférences. Les couleurs sont dites chimiques quand il y a absorption d'une partie de la lumière qui éclaire la matière et que celle-ci ne renvoie que certaines longueurs d'onde. Toutefois, les deux composantes - physiques et chimiques - d'un matériau sont intimement liées dans la production de la couleur. Par exemple, le sulfate de cuivre est bleu mais broyé finement il devient blanc : le phénomène de diffusion de la lumière par les grains très fins l'emporte sur l'absorption (Valeur, 2011). De même, des couleurs qualifiées de physique ne sont pas totalement indépendantes de la nature chimique de la matière : la répartition spatiale des couleurs dans une iridescence est liée à un indice de réfraction qui dépend de la nature chimique même du matériau.

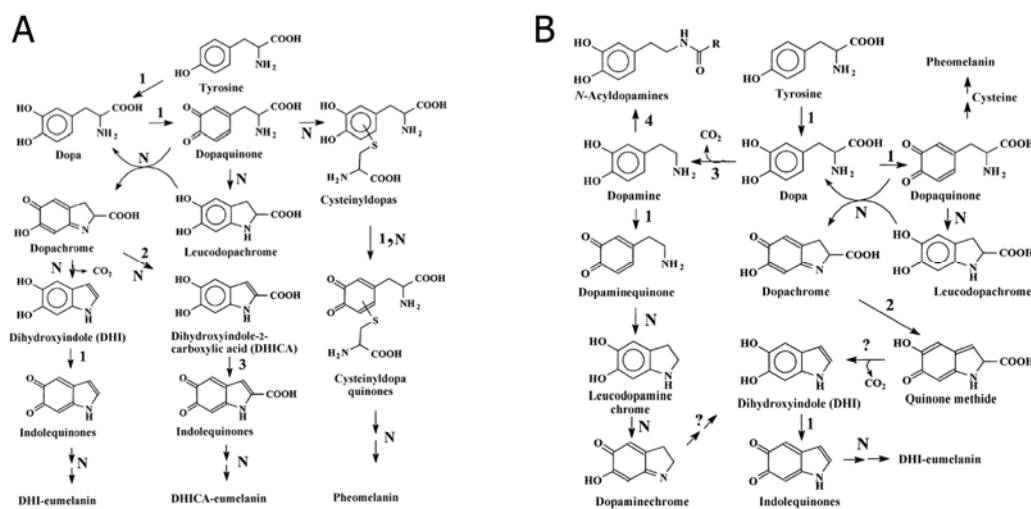
Dans la suite du manuscrit, pour éviter les confusions, j'emploierai le terme de « couleur pigmentaire » pour parler de la composante « chimique » des couleurs et le terme de « couleur structurale » pour parler de la composante « physique » des dites couleurs (Valeur, 2011).

### 3.1 Les couleurs pigmentaires chez les métazoaires

Une multitude de pigments existe chez les métazoaires allant du jaune, vert, bleu, orange, rouge, violet, brun au noir. Ils appartiennent à différentes familles de molécules aromatiques comme les caroténoïdes, les ptérides, les tétrapyroles, les mélanines, les ommochromes, les phénols, les pyrones, les quinones ou encore les zoanthoxanthines. Cette liste n'est pas exhaustive (Bandaranayake, 2006) puisque beaucoup de pigments ne sont pas encore caractérisés, comme par exemple le pigment bleu récemment isolé chez *Synchiropus splendidus* (Perciformes, poisson mandarin ; Fujii, 2000). Les pigments naturels sont produits par des voies de biosynthèse complexes nécessitant de nombreuses enzymes. J'illustrerai ici les voies de synthèse de deux familles de molécules colorées qui présentent un intérêt pour la suite de mon travail que sont la famille des mélanines et des ommochromes.

- **La famille des mélanines** est la famille de pigments la plus étudiée, en particulier, chez les mammifères (et l'Homme) puisqu'ils sont les pigments principaux du derme et de ses phanères. Elle compte parmi les pigments les plus communs. Le mécanisme de formation des mélanines est très complexe et les mécanismes précis pour toutes les variétés ne sont pas encore totalement élucidés. Les mélanines sont des polymères produits par addition ou condensation de monomères formés à partir de la tyrosine (eumélanine) ou de la tyrosine et de la cystéine (pheomélanine), avec le concours de la tyrosinase. La biosynthèse de la mélanine est initiée par l'action de la tyrosinase sur la tyrosine (**Fig. 13A**). La tyrosinase catalyse l'hydroxylation initiale à la fois de la tyrosine et l'oxydation ultérieure de la Dopa en dopaquinone. En présence de cystéine, de la cystéinyldopa est formée,

donnant des pheomélanines de couleur jaune à roux (Passeron *et al.*, 2005). En l'absence de cystéine, la dopaquinone subit une cyclisation non enzymatique qui produit de la leucodopachrome, qui subit une oxydation en dopachrome. Une conversion de la dopachrome catalysée par des ions métalliques génère du DHI (5,6-dihydroxyindole) et DHICA (acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique). Le DHI est le précurseur de la DHI-eumélanine de couleur brun noir. Mais la dopachrome peut aussi être converti en DHICA sous l'action de la dopachrome tautomérase, puis la DHICA oxydase oxyde la DHICA et fournit les quinones nécessaires à la production de la DHICA-eumélanine de couleur jaune à brun. En conséquence, chez les mammifères, l'eumélanine est constituée d'un mélange de DHI-eumélanine et de DHICA-eumélanine (Sugumaran, 2002).

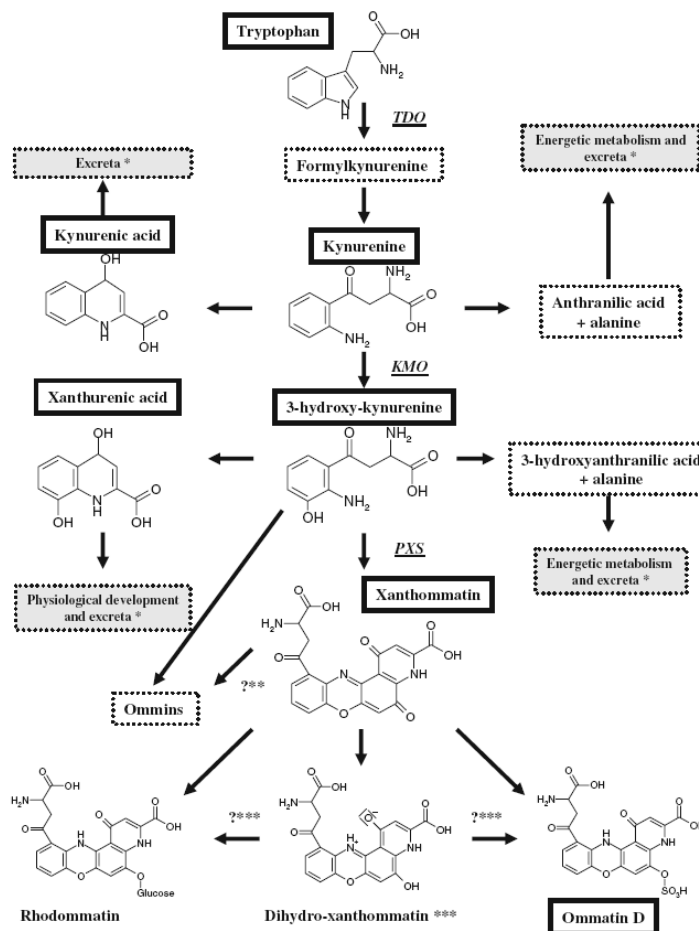


**Figure 13. Schéma illustrant la mélanogénèse chez les métazoaires.** (Sugumaran, 2002). **A**, Mécanisme de la mélanogénèse chez les vertébrés. (1) Tyrosinase. (2) Dopachrome Tautomérase. (3) DHICA oxydase. (N) Réactions non enzymatiques. **B**, Mécanisme de la mélanogénèse chez les insectes. (1) Phénoloxidase. (2) Dopachrome isomérase. (3) Dopa décarboxilase. (4) N-acyltransférase. (N) Réactions non enzymatiques

Une autre voie de synthèse de la mélanine a été découverte chez les insectes et d'autres arthropodes. Les insectes utilisent la phénoloxidase (PO) comme équivalent de la tyrosinase dans les premières étapes de la mélanogénèse (Fig. 13B). La dopachrome isomérase plutôt que la dopachrome tautomérase facilite la mélanogénèse dans ces organismes pour la production de la DHI-eumélanine de couleur noire. La présence de dopachrome isomérase et l'utilisation limitée de la dopa éliminent la production de DHICA et il n'y a donc pas de production de DHICA-eumélanine chez les insectes (Sugumara, 2002). La phénoloxidase oxyde la tyrosine en dopa puis en dopaquinone. La dopaquinone subit une cyclisation pour former de la dopachrome via la leucodopachrome. La dopachrome isomérase catalyse l'isomérisation de dopachrome en quinone méthide qui est ensuite converti en DHI. Le DHI est ensuite oxydé en indolequinones avant de donner la DHI-eumélanine.

Chez les arthropodes, la dopamine (formée par l'action de la dopa décarboxylase) et ses dérivés N-acylés (formés par action du N-acyltransférases sur la dopamine) est utilisée préférentiellement à la place de la dopa. L'oxydation de la dopamine entraîne également la production de DHI-eumélanine.

- **Les ommochromes** sont des molécules dérivées, par polymérisation, d'acides aminés cycliques (essentiellement le tryptophane) et présentes chez de nombreux métazoaires. La voie de synthèse des différents ommochromes n'est pas totalement élucidée et seules les premières étapes sont connues (**Fig. 14**). Les ommochromes sont des métabolites du tryptophane, via la kynurénine et la 3-hydroxykynurénine. Le tryptophane est oxydé par la tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO) en formylkynurénine qui est ensuite hydrolysé en kynurénine à l'aide de la kynurénine formamidase (KFM). La kynurénine est ensuite hydrolysée par la kynurénine 3-monoxygénase (KMO) en 3-hydroxykynurénine (Han *et al.*, 2007). La phénoxazinone synthétase catalyse la condensation de la 3-hydroxykynurénine en xanthommatin (Phillips *et al.*, 1973). Les étapes des voies de synthèse aboutissant aux différentes formes d'ommochromes ne sont pas connues à ce jour.

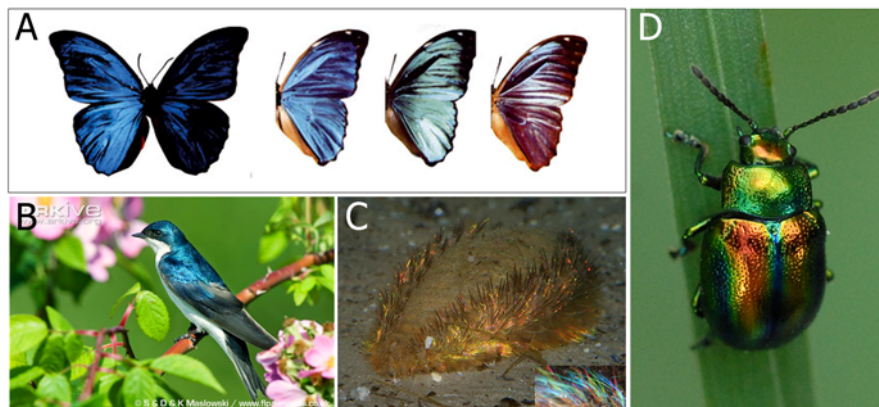


**Figure 14. Voie de synthèse simplifiée et synthétique des ommochromes chez les insectes,** (Riou & Christidès, 2010). **TDO**, Tryptophan 2,3-dioxygénase. **KMO**, kynurénine 3-monoxygénase. **PXS**, Phénoxazinone synthétase. \*Autres voies de métabolismes énergétiques ou d'excrétions, \*\*voie de synthèse hypothétique pour les Ommines, \*\*\*implication hypothétique de la dihydro-xanthommatin dans la synthèse de la Rhodommatin / Ommatine D

Les ommochromes sont responsables d'une grande variété de couleurs, allant du jaune au rouge et du brun au noir. Les couleurs claires ont tendance à être produites par les ommatines, tandis que des mélanges d'ommatine et d'ommines sont responsables de couleurs plus sombres (Oxford & Gillespie, 1998 ; Théry & Casas, 2009).

### 3.2 Les couleurs structurelles chez les métazoaires

La plupart des groupes de métazoaires présentent des capacités à produire des couleurs structurelles. Ces couleurs sont le résultat de l'interaction de la lumière avec des organisations microscopiques ou « nanostructures » (lamelles, grains...). Ces couleurs provoquent des effets directionnels lumineux par opposition aux pigments chimiques qui diffusent la lumière. La plupart de ces structures produisent de la couleur iridescente c'est-à-dire une couleur qui a pour principale caractéristique un changement de teinte en fonction de l'angle d'observation de l'objet ou en fonction de l'angle d'incidence de la lumière (Fig. 15).



**Figure 15. Illustration de l'iridescence chez les Métazoaires.** A, illustration du principe de l'iridescence chez le Lépidoptère *Morpho menelaus* (©Serge BERTHIER, 2003), la couleur varie selon l'angle d'incidence de la lumière par rapport à la perpendiculaire à la surface de l'aile. B, Passériformes *Tachycineta bicolor* (©S. & D. & K. Maslowski). C, Polychètes *Aphrodita aculeata* (©Sytske Dijkzen). D, Coléoptères *chrysolina fastuosa* (©André Mégroz).

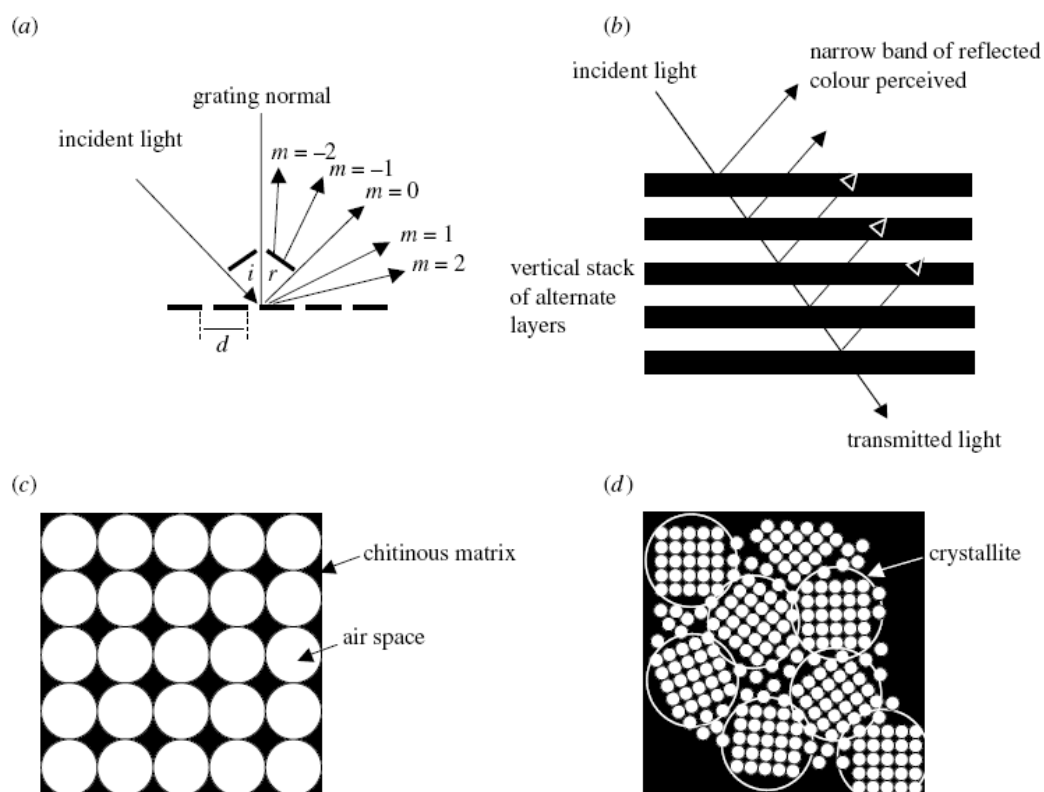
Au cours de l'évolution, une grande variété de nanostructures photoniques naturelles ont été sélectionnées (Parker, 1998 ; Kinoshita *et al.*, 2008). Ces nanostructures peuvent être sous catégorisées en fonction de leur structure :

- **Les réflecteurs multicouches** sont les nanostructures les plus répandues dans le domaine animal (Vukusic & Sambles, 2003). Ces réflecteurs sont constitués de couches minces qui diffèrent par leur indice de réfraction (Fig. 16b). Si l'espacement de ces couches se rapproche de la longueur d'onde de la lumière visible (environ 380 à 750 nm), une ou plusieurs couleurs seront produites par



interférence constructive (Seago *et al.*, 2009). La couleur réfléchi par une structure multicouche dépend de l'indice de réfraction du composant des couches et de leur périodicité. Les couches avec une plus grande épaisseur optique reflètent des longueurs d'onde supérieures aux couches plus minces. La couleur apparente varie également en fonction de l'angle d'observation, pour un angle de l'éclairage donné, si l'angle d'observation augmente, la couleur réfléchi va subir un "décalage vers le bleu" vers une longueur d'onde plus courte, c'est à dire vers la fin du spectre (Vigneron *et al.*, 2006 ; Kinoshita *et al.*, 2008).

- **Les réseaux de diffraction** sont constitués de fentes ou de rainures parallèles périodiques, dont l'espacement est de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde de la lumière (**Fig. 16a**). Chaque fente se comporte comme un diffuseur de ligne de la lumière incidente, diffractant la lumière blanche en ses longueurs d'onde constitutives. L'effet combiné de chaque diffuseur est renforcé pour chaque longueur d'onde à un angle de vue différent, provoquant des couleurs différentes pouvant être perçues à différents angles d'observation.



**Figure 16. Trois types de structures photoniques. (a)**, réseau de diffraction montrant un faisceau de lumière incident diffracté dans différents ordres autour de l'angle spéculaire (miroir). **(b)**, le réflecteur multicouche "idéal", dans lequel des couches alternées sont de la même épaisseur optique, ce qui implique que la lumière soit réfléchi de façon cohérente. **(c)**, structure monocristalline tridimensionnelle constituée d'une matrice contenant de la chitine et des espaces d'air d'environ 250 nm de diamètre. La lumière est réfléchi et diffractée par les interfaces air-chitine plus d'une fois. **(d)**, structure polycristalline tridimensionnelle, dans laquelle la structure est subdivisée en domaines (indiquées par des cercles). (Ingram and Parker, 2008).

- **Les cristaux photoniques tridimensionnels** sont des réseaux périodiques complexes, la lumière d'une longueur d'onde particulière se reflète entièrement, quel que soit l'angle d'incidence (Ingram & Parker, 2008). Les cristaux photoniques sont caractérisés par la présence de bandes interdites, dans lesquelles certaines longueurs d'onde ne peuvent pas se propager en raison de la périodicité en trois dimensions de la structure (Ingram & Parker, 2008). Ils sont généralement composés d'une matrice de matériau à indice de réfraction élevé (par exemple la chitine) contenant des espaces sphériques de matériau à indice de réfraction faible disposés régulièrement (par exemple de l'air) d'environ 250 nm de diamètre (Welch *et al.*, 2005 ; Parker & Martini, 2006 ; **Fig. 16c**). Ceci est souvent appelé « opale inverse », puisque, dans l'opale minérale, un matériau de faible indice de réfraction forme la matrice, dans lequel les sphères de matière à indice de réfraction élevé, le dioxyde de silicium, sont disposés régulièrement. Mais chez les organismes vivants, les cristaux photoniques ne sont pas constitués de matrice en tout point régulière, il s'agit plutôt d'un assemblage irrégulier de domaines réguliers (**Fig. 16d**)

Ces couleurs structurelles se superposent souvent aux couleurs pigmentaires comme chez *Pavo cristatus*, où la mélanine est indispensable à l'établissement du motif coloré, en l'absence de mélanine, comme chez *Pavo cristatus* mut. Alba, l'animal est totalement blanc (Weiss & Kirchner, 2010). La couleur verte, observée chez les amphibiens, les oiseaux (plumes) ou les squamates (tégument) (**Fig. 15**) par exemple, est aussi produite par l'association d'un bleu structurel et d'un jaune pigmentaire (Fox, 1976). Récemment, des chromatophores dichromatiques atypiques, appelés érythro-iridophores, ont été décrits chez *Pseudochromis Diadema*, où une même cellule présente à la fois des pigments et des nanostructures (Goda *et al.*, 2011).

## **4. Développement, génétique et variabilité des motifs chez les métazoaires**

### **4.1 Variations et variabilité des motifs colorés chez certains métazoaires**

Le développement (embryonnaire et post-embryonnaire) est un moment clé dans la mise en place des motifs colorés chez tous les métazoaires, il existe aussi de nombreux cas où les animaux changent de coloration au cours de leur vie adulte, en fonction de la période de leur vie (âge ou stade), en fonction des saisons ou, à plus court terme, en fonction de leur environnement.

- **en fonction de l'âge ou du stade**, essentiellement dans le signalement de la maturité sexuelle ou en fonction d'un changement de mode de vie. Par exemple le juvénile mâle *Lophophorus impejanus* (Gallinacés) ne présente des couleurs vives que quand il a atteint sa maturité sexuelle, avant, son apparence est plus proche de celui de la femelle (**Fig. 17A**). Certaines espèces aquatiques présentent un stade larvaire vivant en pleine eau alors que l'adulte présente un mode de vie benthique avec des motifs colorés beaucoup plus présents (comme c'est le cas chez de nombreux mollusques).

- **en fonction des variations saisonnières**, en réponse à un changement lent mais cyclique de l'habitat. Certains organismes réalisent une mue comme les *Vulpes lagopus* (Canidés) qui présentent un pelage brunâtre pendant l'été et un pelage blanc pendant l'hiver (Fulgei *et al.*, 2000 ; Vâge *et al.*, 2005). Les différentes formes saisonnières du papillon *Precis octavia* sont si différentes les unes des autres que l'on a longtemps supposé qu'il s'agissait d'espèces différentes. La température et la durée de la période jour/nuit au cours de la phase larvaire déterminent le motif coloré chez l'adulte (Protas & Patel, 2008 ; **Fig. 17B**). Enfin, les variations saisonnières peuvent aussi influencer la coloration chez les animaux chez qui les pigments arborés proviennent de l'alimentation et sont donc sujets à une raréfaction (en hiver par exemple).

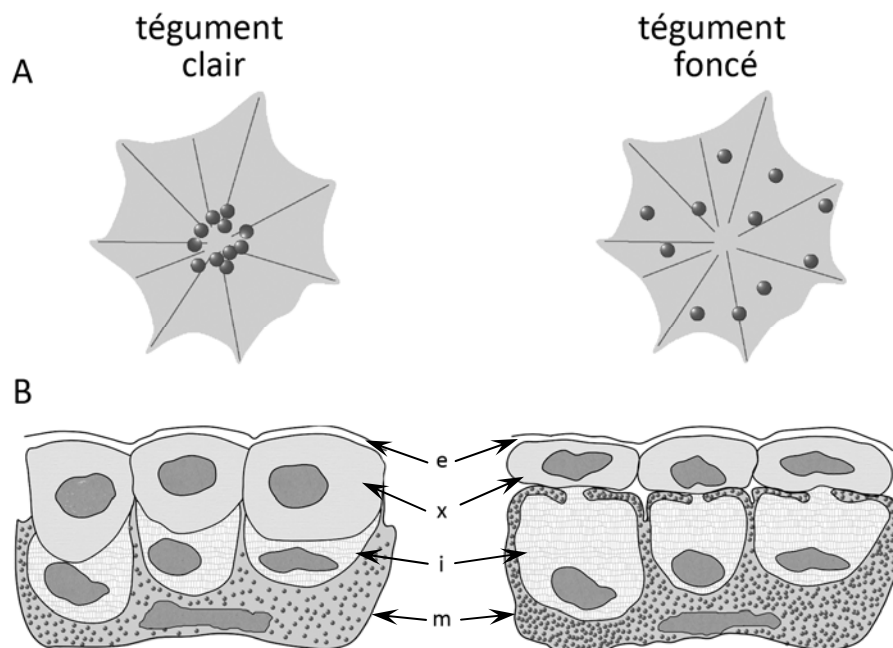


**Figure 17. Quelques exemples de variation de motifs colorés chez les Métazoaires.** A, variation des motifs en fonction du stade chez le Gallinacé *Lophophorus impejanus*, en haut juvénile mâle (©Gérard Cuchet), en bas mâle adulte (©Tim Loseby). B, variation des motifs en fonction de la saison chez le Lépidoptère *Precis octavia*, en haut forme de la saison sèche (©Adrian Hoskins), en bas forme de la saison humide (©M. Purves). C, variation des motifs en fonction de l'environnement chez le Pleuronectiformes *Bothus ocellatus* (©athilapeixe.com).

- **en fonction de l'environnement**, face à un changement rapide et imprévisible de l'habitat. La capacité à changer rapidement de couleur en fonction de l'environnement immédiat de l'organisme existe chez un nombre très limité de familles animales et présente un avantage évident, en terme de camouflage essentiellement, pour les animaux qui se déplacent sur des substrats de différentes couleurs, comme les reptiles, les amphibiens, les céphalopodes et certains poissons plats (**Fig. 17C**). On parle alors d'homochromie variable. Par rapport aux deux cas précédents (stade et saisons), cette capacité engage nécessairement des processus physiologiques bien plus rapides (échelle temporelle de l'ordre de la seconde et/ou de la minute).

Ainsi chez certaines espèces d'amphibiens, de squamates et de poissons, les pigments migrent à l'intérieur des chromatophores le long d'un cytosquelette (translocation de pigment),

provoquant un changement de couleur (**Fig. 18**). Ce procédé est surtout étudié au sein des mélanophores (ou mélanocytes). Chez les poissons, les mélanophores dermiques plats recouvrent souvent les autres chromatophores, ce qui explique que lorsque le pigment se répand dans la cellule, la peau apparaît sombre. Lorsque les granules de pigment sont agglomérés au centre de la cellule, les granules de pigments des autres chromatophores sont exposés à la lumière et la peau prend leur teinte. Cependant, chez les reptiles et les amphibiens, les mélanophores dermiques forment souvent des structures tridimensionnelles avec d'autres chromatophores. Ces structures sont constituées d'une couche supérieure de xanthophores et/ou d'érythrophores, puis d'une couche d'iridophores, et enfin d'une couche de mélanophore avec des prolongements cytoplasmiques remontant jusqu'à la couche des iridophores (Bagnara *et al.*, 1968 ; Rudh & Qvarnström, 2013). Quand la mélanine est agglomérée au centre de la cellule, la peau apparaît verte par le filtrage que réalisent les xanthophores (jaunes) sur la lumière dispersée par la couche d'iridophores, mais lorsque la mélanine se disperse et remonte pour recouvrir les autres chromatophores, la lumière n'est plus décomposée; elle est absorbée par la mélanine et la peau apparaît sombre. Comme tous les chromatophores (mélanophores ou non), peuvent également disperser ou non les granules de pigments dans leur cytoplasme, les animaux avec plusieurs types de chromatophores dans leur peau peuvent générer de cette façon une large gamme de couleurs (Palazzo *et al.*, 1989 ; Porras *et al.*, 2003).



**Figure 18. Translocation des mélanosomes (granules de mélanines) au sein des mélanophores. A, mélanophores de poisson (Welte, 2004). B, structure du tégument d'un anoure d'après Bagnara et al, 1968. e, épiderme ; x, xanthophore ; i, iridophore ; m, mélanophore.**

Le contrôle et les mécanismes de la translocation de pigment ont été bien étudiés sur un certain nombre d'espèces, notamment parmi les amphibiens et les poissons téléostéens (Fujii, 2000 ; Deacon *et al.*, 2003). Chez les amphibiens, le processus de translocation est uniquement sous contrôle hormonal (Aspengren *et al.*, 2009). L'adaptation du motif corporel peut prendre plusieurs heures comme chez *Rana pipiens* (Aspengren *et al.*, 2009). Chez les poissons, ce processus est sous contrôle hormonal et neuronal. Chez *Bothus ocellatus* (poisson plat tropical), l'adaptation des motifs colorés corporels avec le fond sur lequel il repose est réalisée en quelques secondes (Ramachandran *et al.*, 1996) et peut aller jusqu'à une heure chez d'autres poissons (Burton & O'Driscoll, 1992).

En dehors des Vertébrés, une seule famille de métazoaires a développé une capacité à l'homochromie variable rapide : les céphalopodes. Chez eux, la capacité à changer de couleurs est de l'ordre de la fraction de seconde et met en jeu des chromatophores bien spécifiques dans leur structure et leur fonctionnement (structures neuromusculaires). L'état des lieux des connaissances au sujet des couleurs, des motifs et de l'homochromie chez les céphalopodes fait l'objet de la partie 2 de l'introduction.

#### **4.2 Localisation histologique des structures responsable des motifs colorés**

Les différentes structures impliquées dans la production de couleurs se situent essentiellement dans les tissus ou structures externes des organismes :

- ***soit dans le revêtement externe recouvrant l'épiderme***, comme la coquille ou la cuticule.

Chez les Mollusques présentant une coquille externe, les pigments sont incorporés dans la structure même de la coquille, structure qui est sécrétée par les cellules du bord du manteau et dont la forme et les motifs sont contrôlés par un système neurosécréteur (Boettiger *et al.*, 2009). Chez les Arthropodes, et notamment les Hexapodes, les motifs colorés sont localisés dans la cuticule qui forme l'exosquelette. Les couleurs sont souvent de nature structurelle et se mettent en place en même temps que la cuticule elle-même. Les nanostructures font partie intégrante de cette cuticule. Quand, le motif coloré est obtenu par l'intermédiaire de couleurs pigmentaires en plus des couleurs structurelles, les pigments sont sécrétés et associés à la structure même de l'exocuticule composée essentiellement de protéines tannées qui sont responsables de la rigidité de la cuticule (Andersen, 2010).

- ***soit dans l'épiderme*** qui peut contenir lui-même les cellules pigmentaires, comme chez les Mammifères, où elles sont situées dans la couche basale de l'épiderme (Billingham & silvers, 1960), ou être à l'origine des phanères qui intègrent les structures colorées: les poils, les cheveux, les ongles, les écailles, les carapaces, les plumes, etc (Caro, 2013 ; Roulin & Ducrest, 2013).

- ***soit dans le derme*** où il peut y avoir des couches successives de chromatophores de différentes couleurs comme chez les squamates (Bagnara *et al.*, 1968 ; Rudh & Qvarnström, 2013).

### 4.3 Développement et génétique des motifs colorés

Les motifs colorés chez les oiseaux et les mammifères sont générés par les mélanocytes, qui produisent des mélanines et les transfèrent dans les tissus kératinisés et les phanères comme la fourrure ou le plumage. Chez les poissons, les amphibiens et les squamates, les chromatophores conservent leur pigment et c'est leur répartition dans le derme qui détermine le motif (Kelsh, 2004). La plupart des recherches sur le développement des motifs colorés ont porté sur le processus de la pigmentation plutôt que sur les mécanismes de formation des motifs.

Chez la souris, la différence de coloration dorso-ventrale est provoquée par une variation de l'activité de deux transcrits distincts du gène *agouti*. L'un intervient pendant une durée précise pour la production de la bande de pheomélanine spécifique du poil agouti au niveau dorsal et le second est exprimé tout au long du cycle pileux, mais uniquement sur le côté ventral de l'organisme (Mills & Patterson, 2009). Chez les amphibiens un possible homologue au gène *agouti* a été identifié, le facteur d'inhibition de la mélanisation (MIF). MIF est principalement exprimé dans la partie ventrale de l'animal et semble supprimer la production de mélanines, il aurait aussi comme rôle de promouvoir l'apparition d'iridophores dans cette partie de l'animal (Fukuzawa & Bagnara, 1989).

Chez la drosophile, *Drosophila melanogaster*, deux gènes de régulation, *optomotor-blind* (*omb*) et *bric-a-brac* (*bab*), interviennent dans l'établissement des motifs pigmentaires (Wittkopp *et al.*, 2003). Les bandes sombres postérieures portées par la plaque cuticulaire dorsale seraient mis en place par l'intervention de *omb*, lui-même contrôlé par la voie de signalisation Hedgehog (Hh) et l'épaisseur de ces bandes serait sous le contrôle de la voie de signalisation de Decapentaplegic (Dpp). *D. melanogaster* affiche également un motif sexe-dépendant qui ne dépend pas de *omb* mais qui est dû à l'expression (femelle) ou la répression (mâle) de *bab* qui est lui-même sous le contrôle du gène HOX *Abdominal-B* (*Abd-B*) et du gène du déterminisme sexuel *doublesex* (*dsx*) (Kronforst *et al.*, 2012).

Chez les papillons, toute une série de gènes interviennent dans la formation des ailes. Il s'agit notamment des gènes qui codent des facteurs de transcription : *apterous*, qui est exprimé sur les cellules dorsales mais pas ventral ; *wingless* et *Distal-less*, qui sont exprimés le long du bord de l'aile ; *engrailed*, qui est limitée à la partie postérieure de l'aile, et *cubitus interruptus*, qui est limité à la partie antérieure de l'aile. Beaucoup de ces gènes sont redéployés dans la formation des ocelles à l'intérieur de région spécifique de l'aile. *Distal-less*, *engrailed* et *spalt* sont exprimés ensemble au cœur des ocelles et, séparément, dans chacune des bagues de couleur qui les entourent (gradient de diffusion). D'autres gènes sont exprimés à des moments précis dans ou autour des ocelles tel que *cubitus interruptus*, *patched* et *hedgehog*. Des gènes du développement des ailes qui ne sont pas exprimés directement dans la constitution des ocelles, pourraient avoir une influence sur leur position, *decapentaplegic* et *wingless*, ou sur leur taille, *Ultrabithorax* (Carroll *et al.*, 1994 ; Brunetti *et al.*, 2001 ; Beldale *et al.*, 2002 ; Beldade & Brakefield, 2002). C'est en étudiant un tel système que des modèles mathématiques – comme le modèle de Réaction-Diffusion – ont pu être testés pour expliquer comment la réaction et la diffusion de morphogènes permettent la mise en place de motifs à une

échelle (celle de l'organisme) qui dépasse largement l'échelle moléculaire et cellulaire (Asai *et al.*, 1999 ; Torii, 2012).

La mise en place du motif rayé chez *Dario rerio* (poisson-zèbre) suit également un modèle de réaction-diffusion. Les rayures sont formées par l'interaction des mélanophores et des xanthophores par inhibition mutuelle. Ce mécanisme étant activé à distance par les xanthophores, s'arrête par une dépolarisation contact-dépendant quand les mélanophores rencontrent les xanthophores (Inaba *et al.*, 2012). Une étude récente a démontré l'implication d'un troisième type cellulaire participant à l'élaboration des motifs, les iridophores (Frohnhofer *et al.*, 2013). Les iridophores favorisent l'apparition et le maintien des mélanophores. En outre, les iridophores attirent les xanthophores, alors que les xanthophores repoussent les mélanophores. L'interaction entre les trois types cellulaires soutient la formation des bandes qui est initiée par l'apparition des iridophores (Frohnhofer *et al.*, 2013).

De nombreuses études se sont basées sur la synthèse et la régulation des pigments et notamment des mélanines pour l'étude des motifs colorés. Plus de 150 gènes ont été décrits jouant un rôle dans la détermination de la couleur (Hofreiter & Schöneberg, 2010 ; Lamoreux *et al.*, 2010). Un des meilleurs exemples est le gène qui code le récepteur de la mélanocortine-1 (Mc1r), qui appartient à une famille de récepteurs transmembranaires couplés à une protéine G qui sont bien conservés parmi les vertébrés. La quantité d'eumélanine ou de pheomélanine est principalement régie par Mc1r. La liaison de l'hormone stimulant la mélanine alpha-MSH avec Mc1r active la production d'AMPc intracellulaire. Cela induit la transcription du facteur Mitf et augmente l'activité d'enzymes intervenant dans la synthèse de l'eumélanine telles que la tyrosinase. La liaison d'agonistes inverses et antagonistes aux mélanocortines, les protéines signales d'agouti (ASIP), se traduit par une réduction de l'eumélanine et une augmentation de la production de pheomélanine (Roulin & Ducrest, 2013). Mc1r joue un rôle dans la pigmentation de nombreux groupes d'espèces allant des poissons (Maan & Sefc, 2013), des squamates (Olsson *et al.*, 2013) aux oiseaux (Roulin & Ducrest, 2013) et aux mammifères (Hofreiter & Schöneberg, 2010), et contrairement à d'autres gènes impliqués dans la détermination de la couleur tel que le gène *Kit*, où les mutations peuvent être mortelles, généralement les mutations ont des effets pléiotropiques majeurs. Chez les amphibiens, peu d'études ont été menées sur les gènes impliqués dans la détermination des couleurs, le gène Mc1r a été identifié mais les mutations de ce gène ne semblent pas impliquer des grandes variations de phénotype chez les espèces étudiées (Rudh & Qvarnström, 2013). Le clonage d'orthologues de la famille de récepteur de la mélanocortine des mammifères chez divers poissons chondrichthyens indique que les composants du système de la mélanocortine étaient déjà présents avant la radiation des Gnathostomes, mais aucun récepteur de la mélanocortine n'a encore été trouvé en dehors des chordés (Hofreiter & Schöneberg, 2010).

---

## Partie 2

# Couleurs et motifs chez les céphalopodes

---

### 1. Le groupe des céphalopodes

Les céphalopodes (Cephalopoda, du grec képhalé, la tête, et podos, le pied) sont des animaux exclusivement marins appartenant à la famille des mollusques. Environ 700 espèces actuelles de céphalopodes ont été identifiées. Bien que tous les aspects de la phylogénie des céphalopodes ne soient pas encore entièrement résolus (Carlini *et al.*, 2000 ; Lindgren *et al.*, 2004 ; Strugnell & Nishigushi, 2007), les Nautiloïdes se distinguent nettement du groupe des céphalopodes sans coquilles externes que sont les Coléoïdes (Fig. 19). Les Nautiloïdes présentent une coquille externe qui les protège et participe à leur flottabilité. Outre la couleur blanche et brune de la coquille des Nautilés et son motif rayé, seuls leur capuchon et leurs nombreux tentacules autour de la bouche présentent une coloration (également brune ; Fig. 20A). Cette coloration est produite par des grains de pigments (de nature indéterminée), mais l'animal n'a aucune possibilité de changer les motifs de cette coloration (Hanlon & Messenger, 1996).

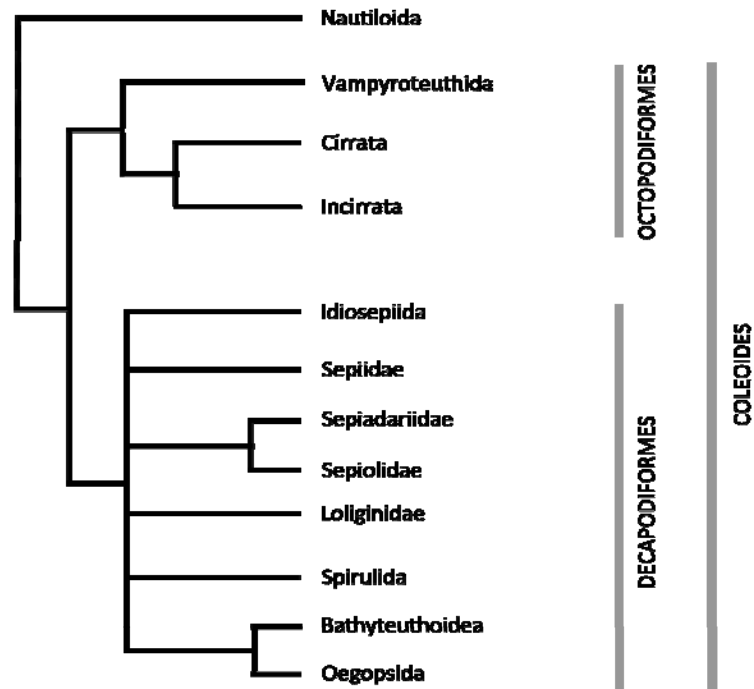
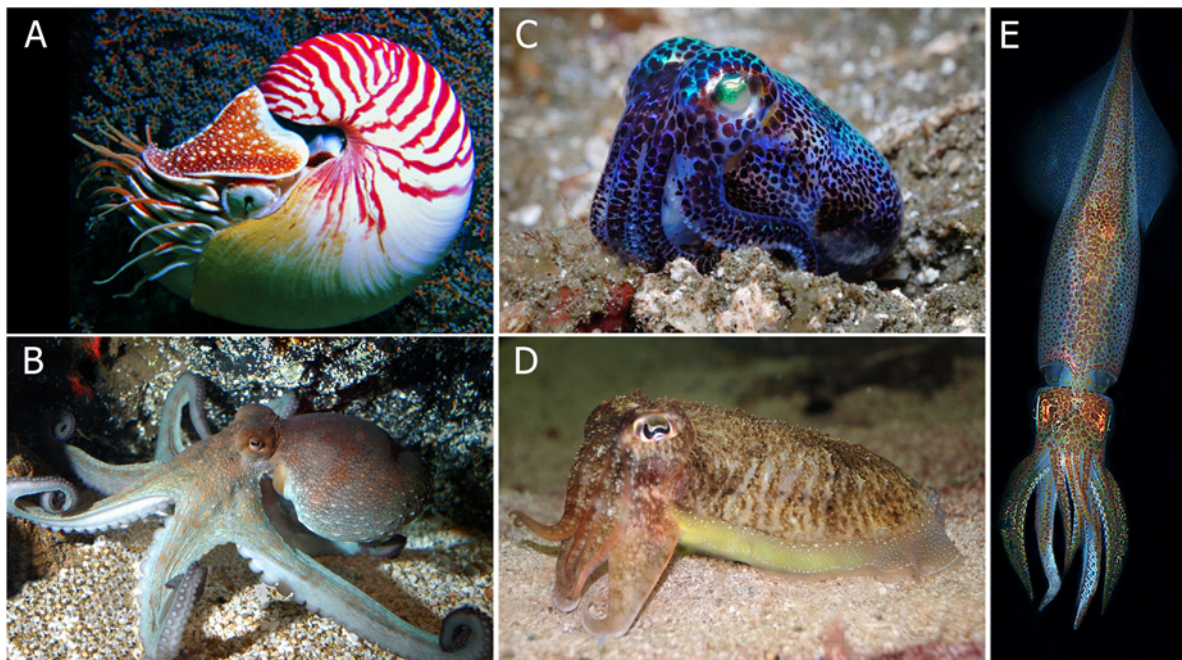


Figure 19. Phylogénie simplifiée des céphalopodes actuels. D'après (Lindgren *et al.*, 2012).



Le groupe frère des Nautiloïdes, les Coléoïdes, présente une grande variété de morphologies et de modes de vie. Le plus petit céphalopode adulte (*Idiosepius*) mesure environ 8mm de long alors que le plus grand (*Architeuthis*) peut atteindre 5 m (Hanlon & Messenger, 1996). Plusieurs espèces de céphalopodes (*Sepia*, *Octopus*, *Loligo*) vivent en eau peu profonde (en zone côtière) alors que d'autres (*Vampyroteuthis*, *Opisthoteuthis*) vivent dans l'océan profond, généralement au dessous de 1000m. L'évolution de ce grand groupe des Coléoïdes marque une étape importante dans l'acquisition d'une grande diversité de couleurs et dans les capacités à modifier son apparence chez les céphalopodes. L'élément fondamental de cette évolution est la perte de la coquille externe. Chez tous les Coléoïdes, la coquille est en effet soit interne (chez la seiche et le calmar) soit presque absente (chez *Octopus*). Une des conséquences de cette réduction de la coquille est que la surface extérieure du manteau se retrouve totalement exposée. C'est dans cette peau extérieure que se retrouvent la grande majorité des structures cellulaires colorées qui permettent les motifs changeants de ces animaux. A ceux-là s'ajoutent également ceux de la tête et des bras (céphalopodium). La peau des Coléoïdes constitue donc un organe complexe de camouflage et d'expression, intimement liée au comportement et au mode de vie (Fig. 20).

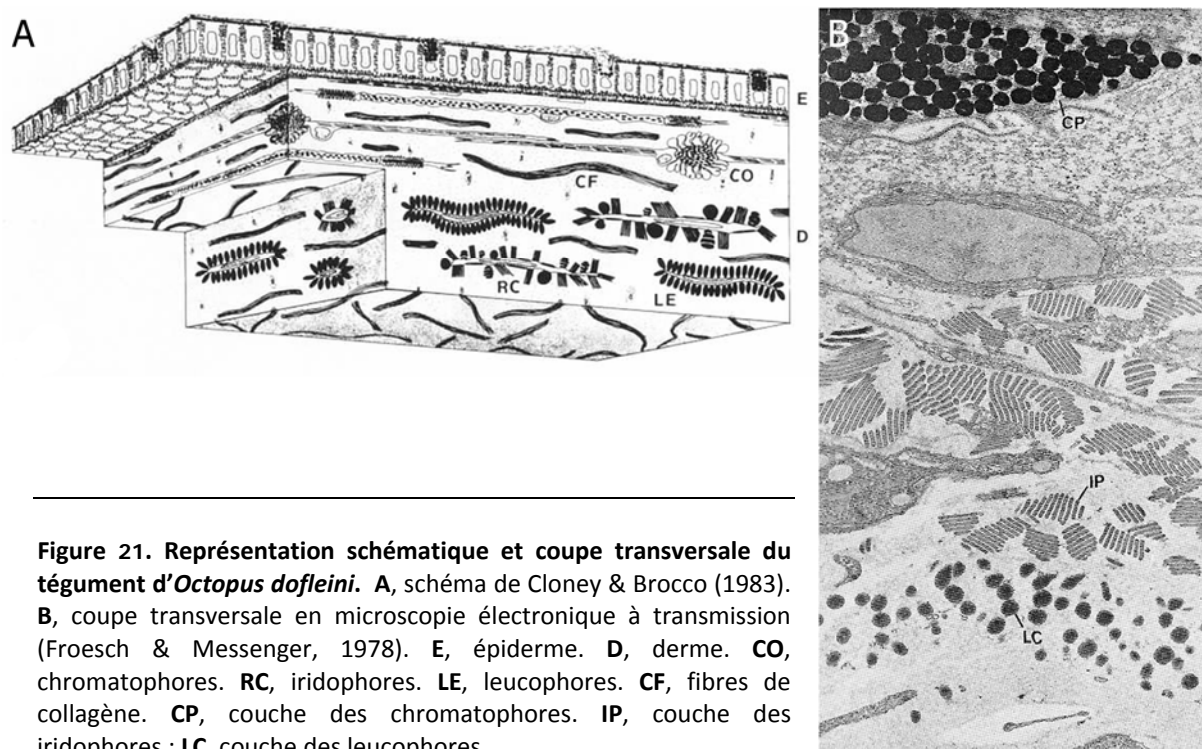


**Figure 20. Exemple d'organismes du groupe des céphalopodes.** A, Nautiloïde *Nautilus pompilius* (©Andrea Ferrari). B, Octopodes *Octopus vulgaris* (©J. C. Shou). C, Sépiolides *Euprymna berryi* (©Rokus Groeneveld). D, Sépioïdes *Sepia officinalis* (©Jarek Tuszynski). E, Teuthoïdes *Loligo vulgaris* (©Stephano Guerrieri).

Les changements chromatiques des Coléoïdes sont les plus rapides du monde animal (de l'ordre de la milliseconde) et beaucoup de Coléoïdes peuvent générer des motifs complexes leur permettant de se camoufler mais aussi de communiquer aux niveaux intraspécifique et interspécifique. Ces motifs colorés sont obtenus grâce à trois structures au sein de leur tégument : les chromatophores, les iridophores et les leucophores.

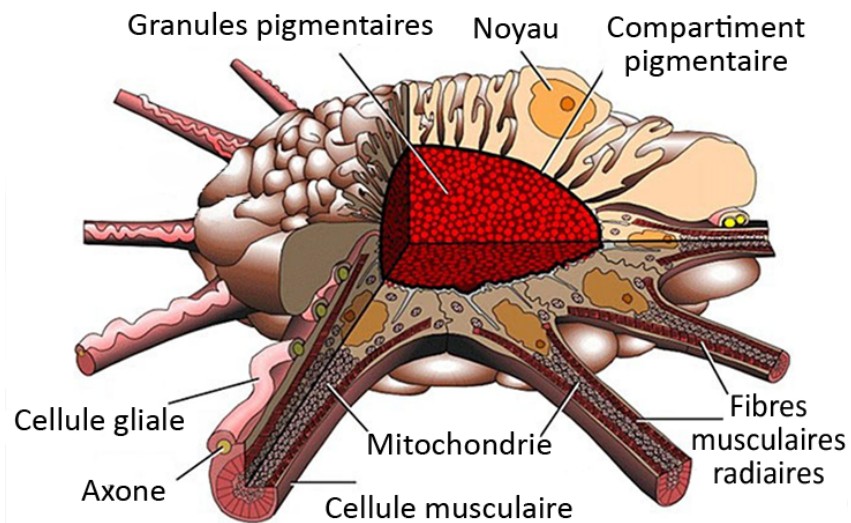
## 2. Des structures tégumentaires colorées spécifiques

Chez les Coléoïdes, ce sont les chromatophores qui influencent le plus la création des motifs colorés. Ils sont positionnés entre l'épiderme (translucide) et les leucophores qui créent une couche de couleur blanche située à la base du tégument. Une troisième couche, constituée d'iridophores, vient compléter le dispositif (entre les chromatophores et les leucophores) en produisant des couleurs structurales iridescentes bleues et vertes (Fig. 21). C'est l'ensemble de ces trois types de structures - leur densité, leur distribution et, à court terme, leur stimulation ou leur repos – qui crée les motifs colorés. Je présenterai ici les principales connaissances issues d'études biochimiques, histologiques et physiologiques de ces structures chez les Coléoïdes adultes.



## 2.1 Les chromatophores

Les chromatophores sont des organes neuromusculaires constitués de plusieurs cellules : une cellule pigmentaire contenant un compartiment qui renferme des granules de pigments (de couleur jaune, rouge-orange ou brun-noir) est entourée par 15 à 25 fibres musculaires radiales (Cloney & Florey, 1968 ; Mirow, 1972a ; Fig. 22). Leur contraction sous contrôle nerveux provoque l'étirement de la cellule pigmentaire et donc du sac pigmentaire qu'elle contient. Le blanc de la couche sous-jacente de leucophores est alors masqué localement par la couleur du chromatophore activé. C'est la combinaison réalisée entre les chromatophores stimulés et les zones où la lumière accède directement à la couche des leucophores qui crée les motifs colorés. Quand les muscles se relâchent, les propriétés élastiques de la cellule pigmentaire conduisent à la rétraction du chromatophore (Messenger, 2001).



**Figure 22. Représentation schématique de la structure d'un chromatophore d'un *Loligo*.** D'après Cloney & Florey, 1968

Les granules de pigments donnent la couleur aux chromatophores mais il existe des différences de chromatophores entre les espèces. Par exemple, *Doryteuthis opalescens* a des chromatophores jaune, rouge, brun (Cloney & Florey, 1968), tout comme *Sepia officinalis* (Hanlon & Messenger, 1988), mais un autre loliginide, *Alloteuthis subulata*, ne dispose que de chromatophores jaunes et rouges (Cornwell *et al.*, 1997), tandis qu'*Octopus vulgaris* a des chromatophores jaunes, orange, rouge, brun et noir (Packard & Hochberg, 1977).

**La nature chimique des pigments n'est pas clairement établie. Si la présence d'ommochromes est supposée depuis longtemps (Schwinck, 1953 ; Linzen, 1967), la**

présence chez *Octopus vulgaris* et *Sepia officinalis* de chromatophores très noirs laisse supposer que de l'eumélanine peut également être produite (Fox & Crane, 1942). Les travaux que j'ai menés sur cette question chez *Sepia officinalis* sont présentés dans le paragraphe 1.3 de la partie 1 des résultats.

## 2.2 Les leucophores

Les leucophores des céphalopodes sont des cellules (de 250 à 1250 nm de diamètre chez *S. officinalis*) dont les milliers de replis membranaires constituent autant de granules ovoïdes incolores appelés leucosomes (Froesch & Messenger, 1978 ; Cloney & Brocco, 1983). Chaque leucosome est une expansion cytoplasmique contenant un granule incolore dont la nature chimique est inconnue (Fig. 23). Les leucophores ont les propriétés optiques d'un diffuseur parfait : ils réfléchissent la totalité des longueurs d'onde de la lumière qu'ils reçoivent (Messenger, 1974). Ils paraissent tout aussi brillants quel que soit l'angle d'observation et ils réfléchissent la lumière à des niveaux constamment élevés (Mäthger *et al.*, 2009a).

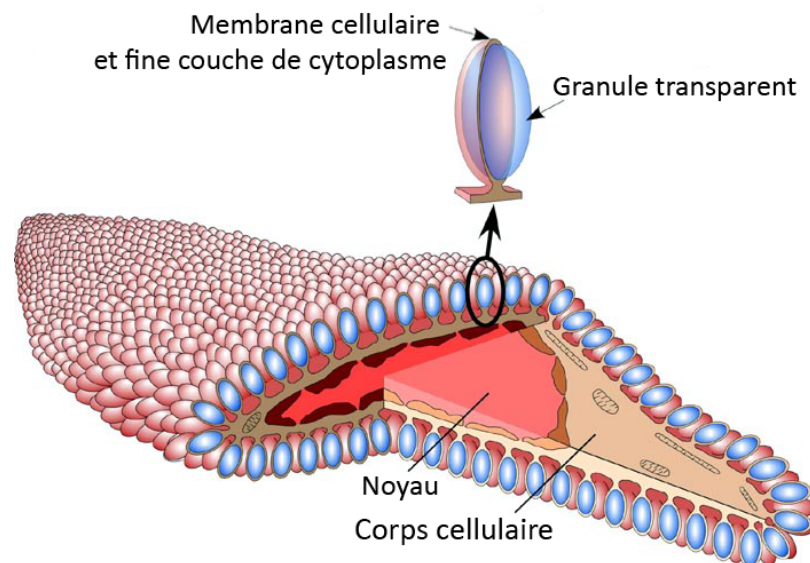
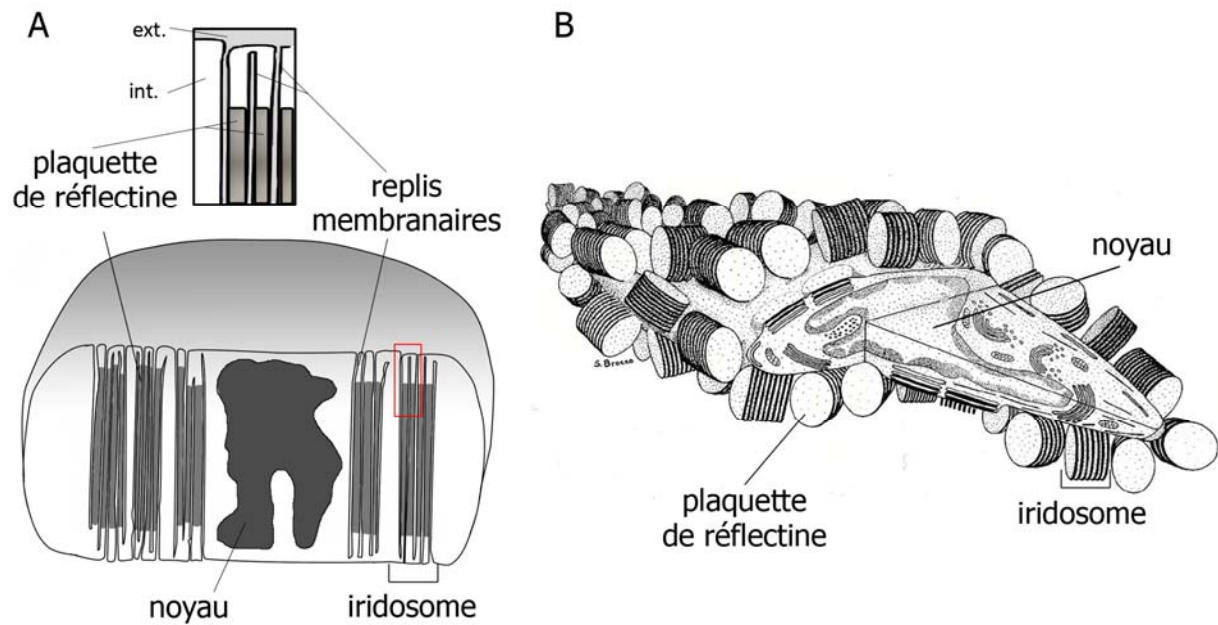


Figure 23. Représentation schématique de la structure d'un leucophore d'*Octopus dofleini*. Dessin modifiée de Cloney & Brocco (1983) par Young, 2004.

## 2.3 Les iridophores

Les iridophores des céphalopodes sont des cellules non-pigmentées d'environ 1mm (Mirow, 1972b) ; Cooper *et al.*, 1990) qui contiennent des réflecteurs multicouches appelés iridosomes (Denton & Land, 1971 ; Land 1972 ; Mäthger & Denton, 2001 ; Mäthger *et al.*, 2004). Chaque iridosome est une zone

de replis membranaires avec la présence du côté cytoplasmique de plaquettes réfléchtrices. Chez *Loligo*, ces replis sont essentiellement localisés vers l'intérieur de la cellule alors que chez *Octopus*, ils constituent des structures externalisées (**Fig. 24**). Ces réflecteurs multicouches ont la capacité de polariser la lumière (Shashar & Hanlon, 1997 ; Shashar *et al.*, 2001 ; Mäthger & Hanlon, 2006). Toutefois, si tous les iridophores peuvent produire de l'iridescence tous ne peuvent pas polariser la lumière (Chiou *et al.*, 2007 ; Mäthger *et al.*, 2009b).



**Figure 24. Représentation schématique de la structure d'un iridophore. A**, Iridophore de *Loligo* d'après Hanlon & Messenger, 1996. **ext.**, milieu extracellulaire ; **int.**, milieu intracellulaire. Encadré rouge représente la zone d'agrandissement. **B**, iridophores d'*Octopus* (Cloney & Brocco, 1983).

Les premières descriptions biophysiques des plaquettes réfléchtrices ont supposé qu'elles étaient composées de chitine (Denton & Land, 1971), mais d'autres études (en particulier des études biochimiques) ont suggéré plutôt une composition protéique (Cloney & Brocco, 1983 ; Cooper *et al.*, 1990). Cette hypothèse a plus tard été confirmée par une étude sur la composition des iridophores dans l'organe lumineux d'*Euprymna scolopes* (Crookes *et al.*, 2004). Il s'agit en fait de différentes protéines, appartenant à la même famille des « réflectines », caractérisées par la répétition de cinq séquences renfermant chacune un sous-domaine hautement conservé (appelé SD par Crookes *et al.*, 2004 [M/FD(X)<sub>5</sub>MD(X)<sub>5</sub>MD(X)<sub>3/4</sub>]) et capables de s'auto-assembler au sein des plaquettes (Kramer *et al.*, 2007 ; Tao *et al.*, 2010).

**La diversité des formes de réflectines au sein de chaque espèce comme entre les espèces de Coléoïdes est encore très peu décrite et l'évolution de cette famille de**

**protéines spécifique des céphalopodes est encore inconnue. Les travaux que j'ai menés sur cette question chez *Sepia officinalis* sont présentés dans la partie 2 des résultats.**

### **3. Diversité des ornements chez les Coléoïdes**

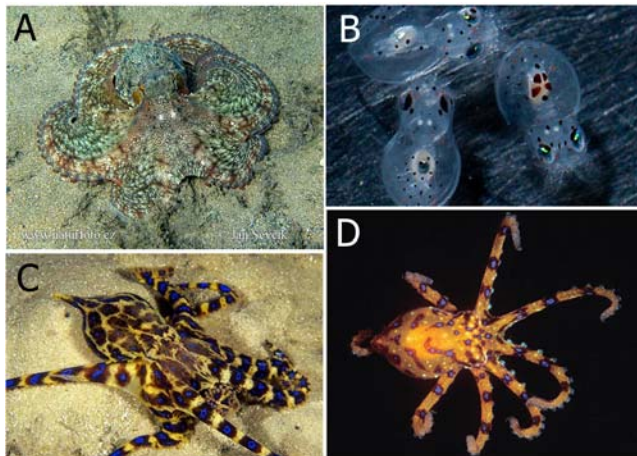
Comme nous l'avons vu dans la première partie de l'Introduction, le motif coloré de la plupart des Métazoaires est fixe. Certes il peut être amené à changer au cours de la vie de l'individu mais dans tous les cas ce sont les processus développementaux (embryonnaires ou post-embryonnaires) qui créent et maintiennent ces motifs fixes. Par contre, chez les organismes capables de changements rapides de couleurs, il n'y a pas un mais plusieurs motifs selon la manière dont l'animal contrôle les structures colorées dont il dispose. Le développement, chez ces organismes, met donc en place plutôt ce que nous appellerons l'« ornementation » de l'individu, c'est-à-dire l'ensemble des structures colorées dont dispose l'animal (aspect statique). Les motifs, eux, résultent de réponses comportementales qui s'appuient sur l'ornementation du corps (aspect dynamique). De manière à bien appréhender l'évolution des motifs colorés chez les Coléoïdes, il est essentiel de bien distinguer ces deux éléments sur lesquelles s'exercent les pressions de sélection : d'une part l'ornementation qui résulte des gènes de développement (quelles structures, dans quelle partie du corps, de quelle manière), d'autre part les motifs qui résultent de choix comportementaux. Cette partie est l'occasion de dresser l'état des lieux des connaissances sur les ornements dans les grandes familles de Coléoïdes de manière à commencer à poser des hypothèses évolutives.

#### **3.1 Les octopodiformes**

Au sein des Octopodiformes (groupe monophylétique de Coléoïdes possédant 8 bras), l'espèce la plus emblématique et la plus étudiée est *Octopus vulgaris*, la pieuvre commune (Incirrata, Octopodidae, **Fig. 25A**). Comme tous les Coléoïdes, cette espèce dispose des trois structures tégumentaires colorées que sont les chromatophores, les iridophores et les leucophores, mais l'ornementation des organismes adultes présente une densité remarquable en chromatophores (jusqu'à 230 par mm<sup>2</sup>; Packard & Sanders, 1969; Packard & Sanders, 1971). Les trois classes de chromatophores (jaune, rouge-orange et brun noir) permettent à cette espèce benthique d'élaborer des motifs colorés très complexes et de se confondre avec son substrat. Les iridophores et les leucophores sont également présents en grande quantité chez l'adulte et impliqués dans des fonctions de camouflage (dissimulation des yeux par exemple) mais aussi d'aposématisme (Hanlon & Messenger, 1996). Les iridophores sont ainsi responsables de la couleur bleue des anneaux des pieuvres venimeuses des côtes australiennes (*Hapalochlaena spp.*; **Fig. 25C**). Enfin, des leucophores peuvent être regroupés et produire des taches blanches caractéristiques comme chez *Octopus macropus* par exemple (Froesch & Messenger, 1978).

Il est intéressant de noter que l'ornementation des octopodiformes n'est pas définitivement déterminée à l'éclosion. Une variation peut en effet s'observer entre les nouveau-nés, les juvéniles et

les adultes, en particulier chez les Octopodes qui présentent une phase para-larvaire. Dans ces espèces, l'éclosion donne naissance à des organismes planctoniques aux caractéristiques morphologiques et comportementales spécifiques (Young & Harman, 1988). Ces para-larves planctoniques adoptent ensuite une vie benthique dans un second temps (Villanueva & Norman, 2008). Alors que l'ornementation adulte d'*Octopus* est dense en chromatophores, l'ornementation des para-larves est constituée de chromatophores en faible nombre et densité. La distribution de ces chromatophores est fixe et spécifique d'une espèce, ce qui permet leur utilisation en taxonomie lorsque les critères anatomiques ne sont pas suffisants. Ainsi la para-larve d'*Octopus vulgaris* ne possède que 8 chromatophores sur la face dorsale du manteau et 16 chromatophores sur sa face ventrale (Fig. 25B). Ces chromatophores présentent un diamètre important par rapport à la taille de l'organisme (70µm en ventral et 100µm en dorsal ; Packard, 1985). Généralement, le nombre de chromatophores est plus élevé sur la face ventrale que sur la face dorsale, ce qui a tendance à s'inverser par la suite chez l'organisme benthique (Packard 1985). On observe enfin une plus petite diversité de couleur chez la para-larve que chez l'adulte (rouge et noir chez *Octopus vulgaris*) ce qui n'autorise que des motifs relativement simples: soit une couleur uniforme soit une totale transparence (Villanueva & Norman, 2008). Concernant les iridophores, ils ne sont présents qu'au niveau des yeux des para-larves (Villanueva & Norman, 2008). Les leucophores, eux, sont absents chez les para-larves, et comme les iridophores, ne commencent à être visibles qu'à la fin de la colonisation du milieu benthique (Villanueva & Norman, 2008).



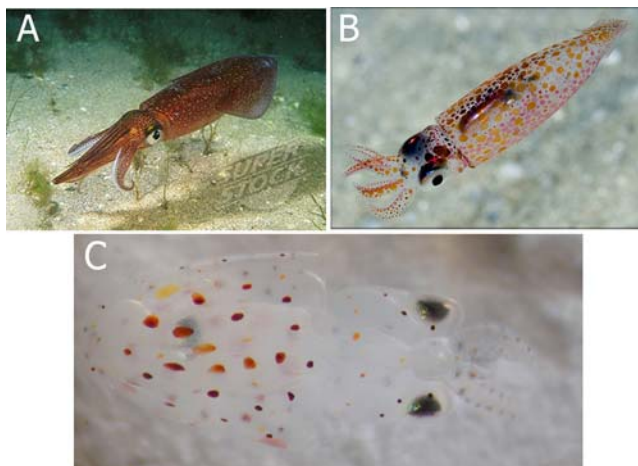
**Figure 25. Espèces d'Octopodiformes adultes et juvéniles.** A, *Octopus vulgaris* adulte (©Jan Sevcik). B, paralarve planctonique de *Octopus vulgaris* (©Richard Ross). C, *Hapalochlaena maculosa* adulte. D, nouveau-né de *Hapalochlaena maculosa* (©David Paul).

A l'échelle des seuls Octopodiformes, on constate que les deux phases, para-larvaires planctoniques et adultes benthiques, présentent des ornements apparemment adaptés à leur milieu/mode de vie : une transparence permettant aux para-larves de passer inaperçues dans la colonne d'eau (peu de chromatophores, une musculature transparente), une richesse en chromatophores permettant aux adultes de se camoufler sur une très large diversité de substrats.

Chez les espèces dont les nouveau-nés sont directement benthiques (sans phase para-larvaire), comme chez *Hapalochlaena maculosa*, il est intéressant de constater que l'ornementation du juvénile est très proche de celle de l'adulte (**Fig. 25D**), lui permettant de produire des motifs complexes dès l'éclosion (Villanueva & Norman, 2008). C'est donc une corrélation très nette entre milieu/mode de vie et ornementation qui semble avoir évolué au sein des Octopodiformes, et l'on voit déjà que la question de la mise en place développementale de ces ornements est cruciale pour comprendre cette évolution.

### 3.2 Les Loliginidés

Au sein des Décapodiformes (groupe monophylétique de Coléoïdes possédant 10 appendices péribuccaux), la famille des Loliginidés regroupe l'ensemble des calmars dont *Loligo vulgaris*. Dans cette famille, les adultes y sont majoritairement pélagiques. Leur ornementation est majoritairement composée de chromatophores, d'iridophores et de très rares leucophores. La densité en chromatophores y est plus faible que chez les octopodes (8 par mm<sup>2</sup> chez *Doryteuthis pleii*) mais les chromatophores y sont aussi généralement plus grands (le plus grand chromatophore complètement développé peut mesurer jusqu'à 1,5 mm de diamètre (Hanlon, 1982). A l'échelle de l'organisme, l'ornementation présente généralement une densité en chromatophore et en iridophores plus grande en face dorsale (manteau et yeux ; **Fig. 26A**).



**Figure 26. Espèces de Loliginidés adultes et juvéniles. A, *Loligo vulgaris* adulte (©Superstock). B, juvénile de *Loligo vulgaris* (©Linda Ianniello). C, para-larve de *Loligo vulgaris* (©Aude Andouche).**

Chez les Loliginidés, les différences d'ornementations entre juvéniles et adultes sont minimales. Ces différences résident essentiellement dans des densités plus faibles chez les juvéniles (Packard & Sanders, 1969 ; Packard & Sanders, 1971). En particulier, la disposition et la couleur des chromatophores (rouges ou jaunes) chez les nouveau-nés sont utilisés en taxonomie pour la détermination des espèces, par exemple, les nouveau-nés de *Loligo opalescens* et *Doryteuthis pealeii* possèdent beaucoup moins de chromatophores que les nouveau-nés de *Loligo vulgaris*, à savoir 100

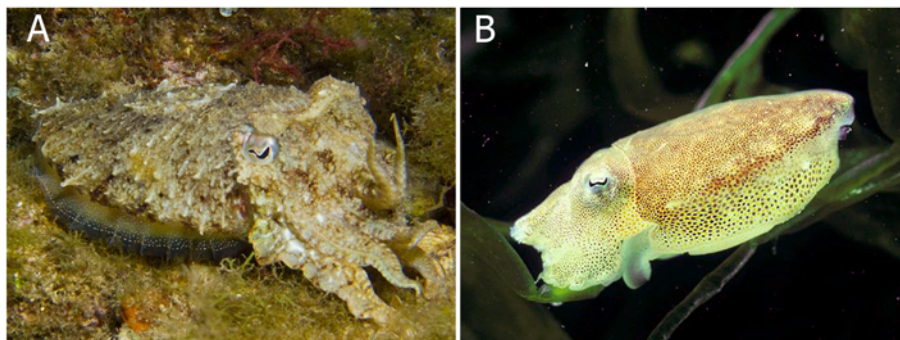


et 97 chromatophores, respectivement, tandis que *Loligo vulgaris* en possède 200 (McConathy *et al.*, 1980 ; **Fig. 26C**). Enfin, on peut noter une modification qualitative des chromatophores : si chez les juvéniles ils sont plus nombreux en face ventrale, chez l'adulte, l'apparition de nouveaux chromatophores en face dorsale inverse cette répartition.

Bien que les modifications d'ornementations post-embryonnaires soient moins contrastées chez les Loliginidés que chez les Octopodiformes, on peut constater encore une fois que les ornements sont nettement adaptés au milieu/mode de vie. Les nouveau-nés possèdent peu de motifs colorés et peuvent apparaître soit foncés ou transparents selon la rétractation de leurs chromatophores ce qui leur permet de passer inaperçus dans la colonne d'eau. Notons également que si les leucophores sont absents chez les Loliginidés, ils sont présents dans l'ornementation des *Sepioteuthis* qui présentent un mode de vie plus necto-benthique que pélagique.

### 3.3 Les Sepiidés

Les Sepiidés (appartenant également aux Décapodiformes) constituent la famille qui regroupe l'ensemble des seiches dont la seiche commune, *Sepia officinalis* (**Fig. 27**), dont le mode de vie est majoritairement necto-benthique. L'ornementation des seiches adultes est richement composée des trois éléments chromatiques : chromatophores, iridophores et leucophores. La densité en chromatophores est d'environ 50 par mm<sup>2</sup> chez la seiche adulte avec une plus faible densité en face ventrale. On distingue trois classes de chromatophores (jaune, rouge orange et brun-noir) avec une taille de chromatophores pouvant atteindre 300µm de diamètre pour les plus gros chromatophores en position rétractée (Hanlon & Messenger, 1988). Les iridophores sont essentiellement localisés au niveau des yeux, des bras (lignes roses) mais aussi sur la face ventrale du manteau (couleur iridescente verte ou bleu). Les leucophores, eux, sont présents sur toute la surface du corps : ils participent en association avec l'activité des chromatophores à la production de tâches blanches et de zébrures (voir paragraphe 4.1c ; Froesch & Messenger, 1978).



**Figure 27. Espèces de Sepiidés adultes et juvéniles. A, *Sepia officinalis* adulte (©Anthony Leydet). B, juvénile de *Sepia officinalis* (©gettyimages.com).**

Chez *Sepia officinalis*, les nouveau-nés ont un mode de vie essentiellement épibenthique et présentent une ornementation très semblable à celle des adultes. La densité de ses chromatophores est dix fois plus élevée que chez l'adulte (Hanlon & Messenger, 1988), une densité même supérieure aux *Octopus* benthiques adultes. Les iridophores sont présents mais semblent être absents de la face ventrale du manteau à l'éclosion (Hanlon & Messenger, 1988). Seul, les leucophores sont totalement absents à l'éclosion, et ne se mettent en place que 20 semaines après l'éclosion au moment de la maturation sexuelle (Hanlon & Messenger, 1988). Malgré, l'absence de certains éléments chromatiques, les nouveau-nés de *Sepia officinalis* sont capables de produire 9 des 13 motifs colorés répertoriés chez l'adulte.

Chez les Coléoides, l'ornementation de l'organisme est étroitement corrélée au mode de vie et au milieu de vie et cette corrélation vaut pour les différents stades ontogéniques (juvéniles, para-larves et adultes ; Packard, 1985 ; Hanlon & Messenger, 1996 ; Messenger, 2001). La question de l'évolution et de la sélection des différentes ornementations se pose donc à l'échelle des grandes familles de Coléoides, des genres voire des espèces elles-mêmes. Ainsi des ornementations assez similaires, comme par exemple une grande richesse en chromatophores, peuvent se retrouver dans des familles distantes de Coléoides, comme celles d'*Octopus* et de *Sepia*. **Est-il encore possible d'établir quelle pouvait être l'ornementation ancestrale du premier Coléoïde ? Était-elle simple et s'est-elle complexifiée chez les Octopodes et les Sepiidés ou bien était-elle complexe et des simplifications ont-elles eu lieu chez les Loliginidés par exemple ?**

**Les travaux que j'ai menés pour tenter de comprendre la mise en place au cours du développement des chromatophores et des iridophores chez *Sepia officinalis* peuvent contribuer à alimenter cette question et sont présentés dans les parties 1 et 2 des résultats.**

#### **4. Motifs corporels colorés et dynamiques.**

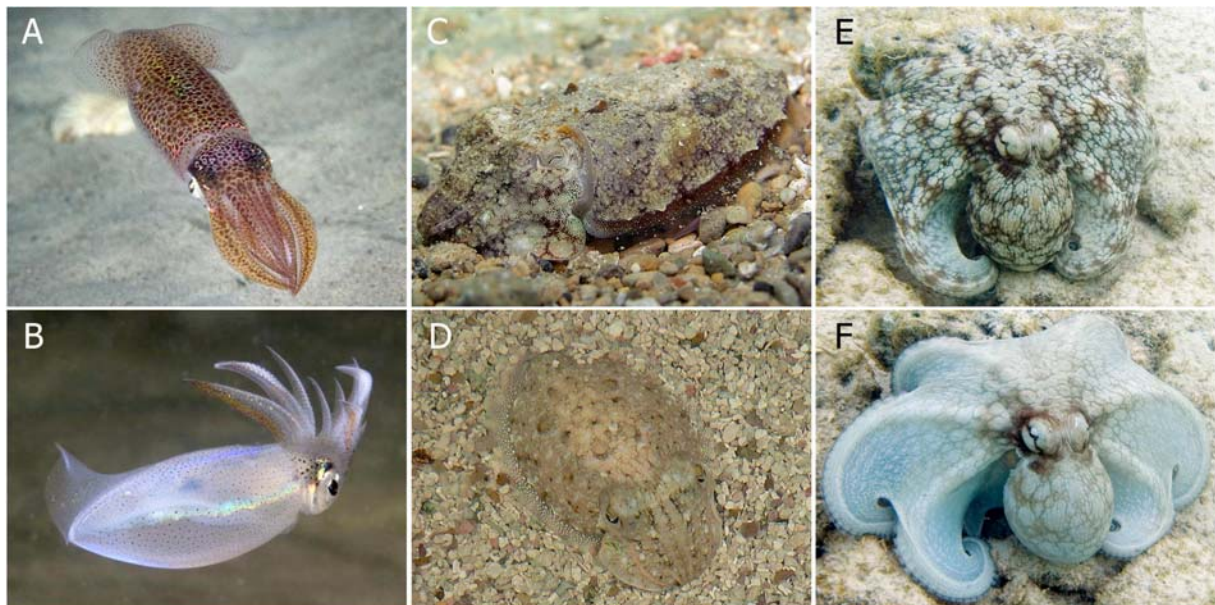
Dans une espèce donnée (donc pour une « ornementation » donnée), l'aspect dynamique du contrôle des chromatophores permet la réalisation de nombreux motifs dont la sélection résulte des processus que nous avons évoqués en partie 1. Je ferai ici l'état des lieux des principaux motifs rencontrés chez les différents Coléoides en lien avec leur fonction.

##### **4.1 Le camouflage**

###### a) Homochromie variable et homotypie

Les pieuvres et les seiches qui ont respectivement un mode de vie benthique ou necto-benthique, peuvent se confondre avec le substrat sur lequel elles reposent en mimant la couleur, le motif et la texture de celui-ci (Hanlon & Messenger, 1988). L'homochromie variable des céphalopodes leur

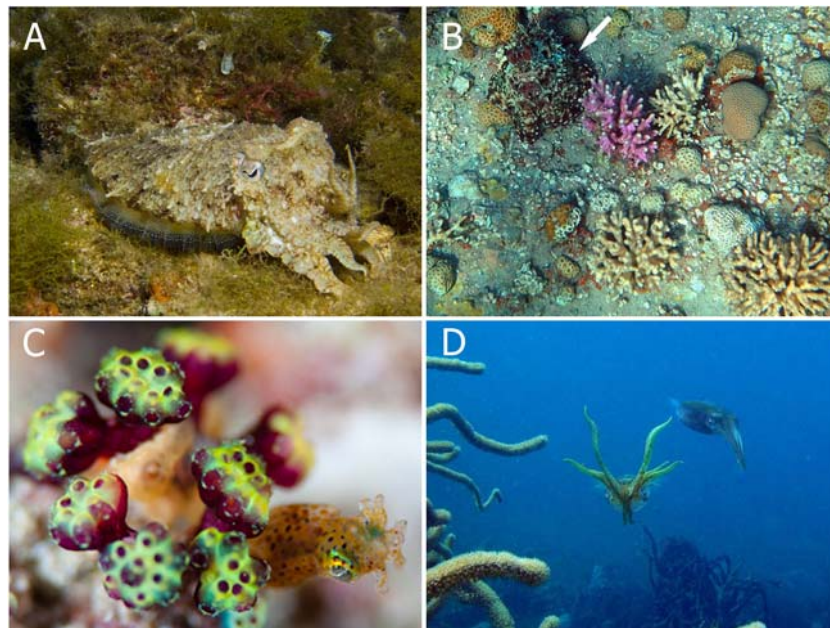
permet de se conformer étroitement avec une grande diversité de milieux (**Fig. 28**). Ainsi, *Sepia officinalis* peut se fondre avec du sable ou des graviers de différentes granulométries. L'animal est non seulement en mesure d'estimer le degré de granulométrie de son environnement mais aussi de prendre en compte sa propre taille lors de la sélection du motif corporel approprié en dilatant un certain nombre de chromatophores et en relâchant les autres (Hanlon & Messenger, 1988 ; Chiao & Hanlon, 2001). Les chromatophores contrôlent indirectement la qualité de la lumière parvenant aux cellules réfléchissantes dans les couches inférieures. Les chromatophores rouges et jaunes transmettent une grande partie de la lumière incidente et jouent donc un rôle important dans la modulation de l'iridescence. Les chromatophores bruns transmettent beaucoup moins de lumière, cette opacité permet de bloquer l'iridescence pour produire l'aspect le plus sombre possible des motifs corporels (Mäthger & Hanlon, 2007).



**Figure 28. Exemples d'homochromie variable chez les céphalopodes.** A-B, *Loligo vulgaris* (©Kåre Telnes) ; C-D, *Sepia officinalis* (©C-Pablo Valero, D-Mark Raul) ; E-F, *Octopus vulgaris* (©Paul Asman & Jill Lenoble).

Chez certains Sepiidés et Octopodidés, l'imitation des couleurs s'accompagne également d'une imitation de la texture grâce à la mise en jeu de groupes musculaires localisés sous la peau (**Fig. 29A-B**). Ces muscles sont regroupés en unités physiologiques baptisées « papilles » (Hanlon & Messenger, 1988), capables de créer de simples bosses ou des extensions de peau beaucoup plus longues (10mm), ce qui diversifie d'autant les apparences que peut prendre l'animal (Allen *et al.*, 2013). Ainsi *Idiosepius pygmaeus* peut se confondre avec certaines algues (un organe dorsal adhésif

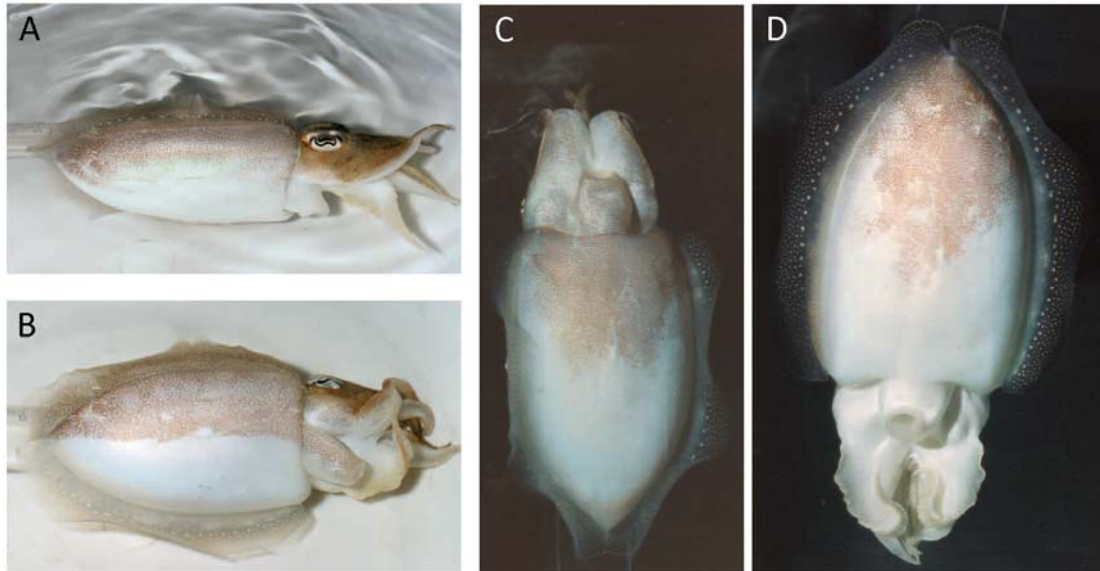
lui permet de rester fixé dessus ; **Fig. 29C**) et le calmar *Sepioteuthis sepioidea* peut ressembler à des branches de coraux quand il dérive en ayant les bras en forme de V (**Fig. 29D**).



**Figure 29. Exemples d'homotypie chez les céphalopodes.** A, *Sepia officinalis* (©Anthony Leydet) ; B, *Octopus* (flèche blanche) imitant les coraux alentour (©Zvika Livnat) ; C, *Idiosepius pygmaeus* (©Adam Broadbent) ; D, *Sepioteuthis sepioidea* (©Jean Michel Sutour).

#### b) Ombre inversée

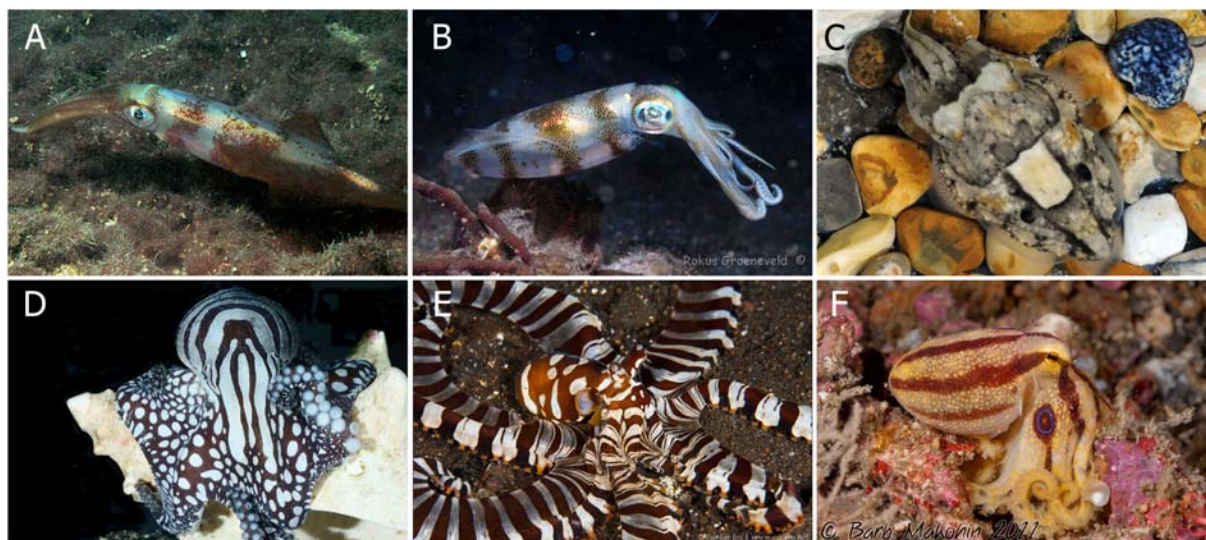
La plupart des céphalopodes ont plus de chromatophores sur la surface dorsale du corps que sur la face ventrale. La face dorsale légèrement plus foncée que la face ventrale rend le calmar moins visible dans la colonne d'eau en vue latérale, même sous des angles obliques élevés. Pour cela, les chromatophores dorsaux sont étendus, les chromatophores ventraux sont rétractés, tandis que ceux situés sur le manteau latéral et les bras montrent un dégradé entre les deux extrêmes (Hanlon & Messenger, 1996). Les céphalopodes sont même capables de maintenir cet effet d'ombre inversée quand ils sont désorientés (CSR pour « countershading reflex » : réflexe de l'ombre inversée). Ce phénomène a été observé chez *Sepia officinalis*, *Loligo vulgaris* et *Octopus vulgaris*. Lorsque ces organismes sont tournés de 180 degrés autour de l'axe longitudinal du corps, les chromatophores ventraux se dilatent tandis que les chromatophores dorsaux se rétractent. De même, si ces organismes ne sont tournés que de 90 degrés, les chromatophores de la moitié supérieure de la face ventrale et dorsale du manteau se dilatent tandis que celles sur la moitié inférieure se rétractent (**Fig. 30**). Ce phénomène de déplacement de l'assombrissement d'une partie du manteau se produit également si l'organisme est placé tête en bas ou inversement (Ferguson & Messenger, 1991). Le réflexe est lié à la perception de la gravité par les statocystes (Ferguson *et al.*, 1994).



**Figure 30. Illustration du réflex d'ombre inversée chez *Sepia officinalis*.** Photos extraites de Ferguson *et al.*, 1994. **A**, rotation inférieure à 90° par rapport à l'axe du corps. **B**, rotation de plus de 90°. **C**, animal tête en haut. **D**, animal tête en bas.

### *c) Coloration disruptive*

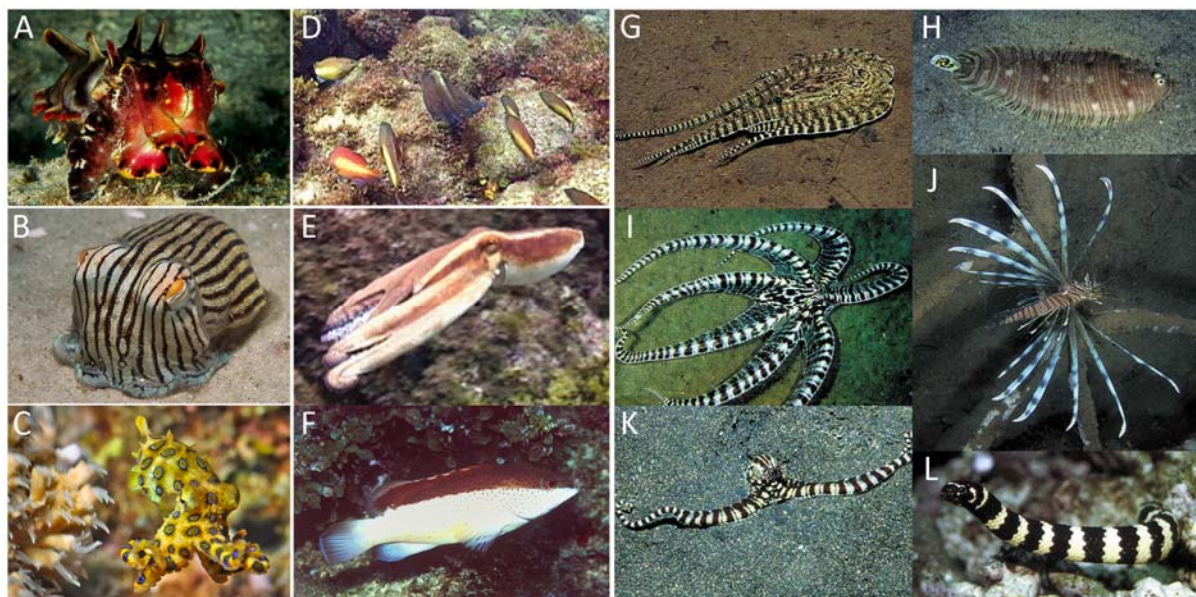
Sur un fond bigarré, la seiche adopte un motif coloré disruptif, dont l'effet est de découpler visuellement une partie du corps du reste, brisant l'intégrité apparente de l'animal. Les Sépioïdes passent une partie de leur vie posés ou partiellement posés sur des fond très variables, la coloration disruptive est le meilleur moyen de passer inaperçu (Roper & Hochberg, 1988 ; Hanlon *et al.*, 2008). Les céphalopodes ayant une forme allongée, comme *Loligo* (Fig. 31A) et *Sepia* (Fig. 31C), peuvent produire des bandes pour casser l'uniformité de leur corps (Hanlon & Messenger, 1996). Chez *Octopus vulgaris*, des tâches blanches peuvent être produites (Packard, 1988) et certains *Octopus*, appelés pieuvres arlequins (*Octopus chierchiae*, *Octopus zonatus* and *Amphioctopus motoli* ; Moynihan, 1985) présentent des motifs disruptifs, de nombreuses bandes et tâches noires et blanches (Fig. 31D-F), qui sont semi-permanents (Hanlon & Messenger, 1996).



**Figure 31. Exemples de coloration disruptive chez les céphalopodes.** A, *Loligo vulgaris* (©Anne Frijsinger & Mat Vestjens) ; B, *Sepioteuthis lessoniana* (©Rokus Groeneveld) ; C, *Sepia* sp (©Sarah Zylinski) ; D, *Octopus chierchiae* (©Roy Caldwell) ; E, *Wunderpus photogenicus* (©Dogan ÖZDEMİR) ; F, *Amphioctopus mototi* (©Barb Makonin).

#### 4.2 L'aposématisme et le mimétisme

Les céphalopodes montrent peu de signaux de défense primaire, aposématisme et mimétisme. Seules quelques espèces de céphalopodes sont connues pour être toxiques ou venimeuses : *Metasepia pfefferi* (Sepiidae, Fig. 32A), *Sepioloidea lineolata* (Sepiariidae, Fig. 32B) et les octopodes du genre *Hapalochlaena* sp. (Fig. 32C). Ces espèces, renfermant une toxicité à la tétrodotoxine, présentent des motifs aposématifs (Hanlon & Messenger, 1996). Certaines pieuvres imitent également des poissons eux-mêmes aposématifs : *Octopus cyanea* peut ainsi ressembler en forme et en motifs colorés aux poissons perroquets des récifs coralliens du pacifique (Hanlon *et al.*, 1999). Krajewski *et al.* (2009), ont mis en évidence un exemple de mimétisme social, une forme de protection contre les prédateurs en se mêlant à des espèces dont ils imitent la forme et la couleur : *Octopus insularis* imiterait ainsi temporairement les poissons du banc au sein duquel il va rechercher une protection (Krajewski *et al.*, 2009 ; Fig. 32D-F). Certaines espèces de pieuvre montrent une aptitude dans l'imitation des poissons plats (*Zebrias* sp), par des motifs colorés similaires mais aussi et surtout par une imitation comportementale de la nage (Hanlon *et al.*, 2008 ; Fig. 32G-H). Ce phénomène a également été rapporté chez le « Mimic Octopus » *Thaumoctopus mimicus* (Norman *et al.*, 2001), *Macrotritopus Defilippi*, la pieuvre « White V » et « Hawaiian Long-Armed Sand Octopus » (Hanlon *et al.*, 2008 ; Hanlon *et al.*, 2010). Contrairement aux trois dernières pieuvres qui vont privilégier le camouflage même pendant l'imitation de la nage, *Thaumoctopus mimicus* montre systématiquement des motifs colorés très contrastés (Hanlon *et al.*, 2008). *Thaumoctopus mimicus* est aussi connu par le fait de mimer d'autres espèces animales : *Pterois* spp. (rascasse-volante, Fig. 32I-J) ou *Laticauda* spp. (serpent de mer venimeux, Fig. 32K-L ; Norman *et al.*, 2001).



**Figure 32. Illustrations de l'aposématisme et du mimétisme chez les céphalopodes.** A-C, exemples de motifs aposématiques. D-L, exemples du mimétisme chez deux espèces d'Octopodes. A, Sépiidé *Metasepia pfefferi* (©Jenny Huang). B, Sépiadariidé *Sepioloidea lineolata* (©Tony Brown). C, Octopde *Hapalochlaena lunulata* (©Okinawa Nature Photography). D-F, photos extraites de Krajewski *et al.*, 2009, *Octopus insularis* imitant des *Cephalopholis fulva* (poissons récifaux). G-L, exemples du mimétisme chez *Thaumoctopus mimicus*, photos extraites de Norman *et al.*, 2001.

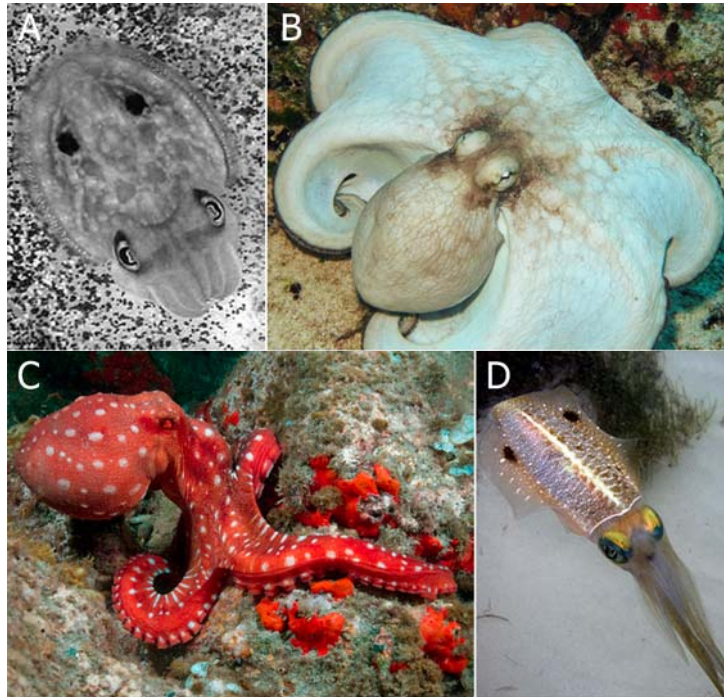
#### 4.3. La communication

Les céphalopodes utilisent aussi les motifs colorés pour communiquer avec d'autres organismes, congénères ou non, et ce phénomène a été étudié en détail chez de nombreuses espèces.

##### *a) communication interspécifique*

En dehors des éventuels signaux aposématiques chez un petit nombre de céphalopodes, la plupart des céphalopodes présentent des motifs et des postures particulières lors des rencontres avec leurs proies ou leurs prédateurs. Ainsi la seiche (*Sepia officinalis*) comme la pieuvre commune (*Octopus vulgaris*) peuvent produire des vagues sombres se déplaçant à la surface dorsale du manteau jusqu'au bout des bras quand ils sont en présence d'une proie ce qui permet de détourner l'attention de la proie au moment de l'attaque (Messenger, 1968 ; Hanlon & Messenger, 1996). Face à des prédateurs potentiels, des motifs et des postures menaçantes sont également produits chez la plupart des espèces de céphalopodes. Ils impliquent généralement la création soudaine de rayures, souvent renforcée par l'extension des bras, des nageoires ou des tissus de l'animal qui le font paraître plus gros et plus menaçant (Hanlon & Messenger, 1996). Chez *Sepia officinalis*, le signal est réalisé par un aplatissement du corps, une peau pâle, la présentation d'une paire d'ocelles sur le manteau, de cernes sombres autour des yeux et d'une ligne foncée sur les nageoires, et par une dilatation des pupilles

(Hanlon & Messenger, 1996 ; Adamo *et al.*, 2006 ; **Fig. 33A**). *Octopus vulgaris* affiche la même peau pâle et des cernes sombres avec des pupilles dilatées, mais ses bras se courbent également en de larges arcs de cercle et les tissus entre les bras s'étendent autant que possible (Hanlon & Messenger, 1996 ; **Fig. 33B**). D'autres pieuvres, comme *Octopus macropus*, deviennent rouge-brunâtre clair avec des taches ovales très blanches sur toute la surface du corps créant un motif très contrasté (Hanlon & Messenger, 1996 ; **Fig. 33C**).



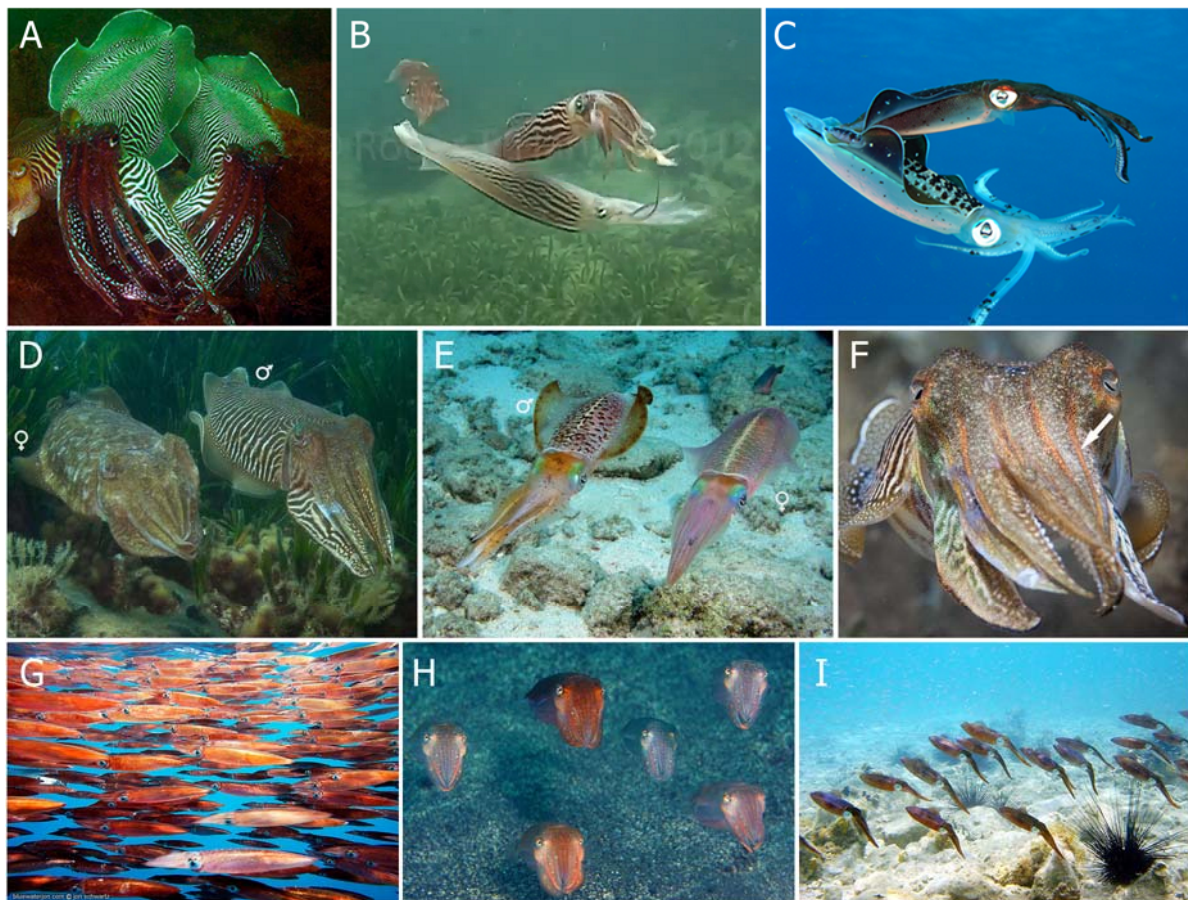
**Figure 33. Exemples de motif de mise en garde chez les céphalopodes. A, *Sepia officinalis* (extrait de Langridge, 2006) ; B, *Octopus vulgaris* (©Florent Charpin) ; C, *Octopus macropus* (©J Carlos Moreno) ; D, *Sepioteuthis sepioidea* (©Dave Rudie).**

#### *b) communication intraspécifique*

*Sepia officinalis* est un animal solitaire, la communication intraspécifique est alors essentiellement utilisée au moment de la reproduction et lors de rencontres furtives avec un autre congénère. Au moment de la parade nuptiale, le mâle mature arbore un motif zébré blanc et noir employé pour attirer la femelle. Ce même motif est arboré lors de rencontres agonistiques avec d'autres mâles (Messenger, 2001). Ce motif se caractérise par une série de bandes, des lignes blanches sur les nageoires, des tâches blanches sur les bras et des anneaux sombres autour des yeux (**Fig. 34A, D**). Des motifs impliquant un contraste important avec des bandes noires et blanches sont également présents chez d'autres espèces, notamment *Doryteuthis plei* (DiMarco & Hanlon, 1997 ; **Fig. 34B**), *Octopus cyanea* (Messenger, 2001) ou *Sepioteuthis sepioidea* (Hanlon & Messenger, 1996 ; **Fig. 34C**,



E). Chez plusieurs espèces de céphalopodes pélagiques tels que les calmars (*Loligo vulgaris*, *Doryteuthis pealeii*, *Alloteuthis subulata*, *Loliolus noctiluca*) des lignes longitudinales rouges et vertes iridescentes sont présentes sur la face dorsale du manteau. Ces lignes semblent participer à la communication entre individus, et plus particulièrement, à la coordination des mouvements de chaque individu au sein du banc (Mäthger & Denton, 2001 ; Mäthger *et al.*, 2009a ; **Fig. 34G**). Des lignes similaires sont visibles sur les bras et les tentacules de *Doryteuthis pealeii* (Chiou *et al.*, 2007) et sur les bras de la seiche *Sepia officinalis* (Shashar *et al.*, 2001 ; Mäthger *et al.*, 2009b ; **Fig. 34F, H**).



**Figure 34. Exemples de motif de communication intraspécifique chez les céphalopodes. A-C**, motifs arborés lors de conflit avec un autre individu, ici entre deux mâles. **D-E**, motifs arborés lors de parade nuptiale. **G-I**, motifs arborés lors du déplacement de céphalopodes en Banc. **A**, *Sepia officinalis* (©Alan James/naturepl.com) ; **B**, *Doryteuthis plei* (Extrait d'une video de ©Roger T Hanlon) ; **C, E**, *Sepioteuthis sepioidea* (©Debbie Lanham) ; **D**, *Sepia officinalis* (©Alain Bonnet/doris.ffessm) ; **F**, lignes iridescentes (flèche blanche) le long des bras de *Sepia officinalis* (©Jayhem). **G**, Banc de *Loligo vulgaris* (©Jon Schwartz) ; **H**, petit groupe de *Sepia sp.* (©Ken Kasuga) ; **I**, Banc de *Sepioteuthis sepioidea* (©Caroline Rogers).

Les céphalopodes produisent de nombreux et complexes signaux chromatiques mais plusieurs études ont montré que les céphalopodes seraient dans l'incapacité de visualiser les couleurs (Marshall

& Messenger, 1996 ; Mäthger *et al.*, 2006). Il a été démontré que les céphalopodes ont néanmoins la capacité de produire des motifs de polarisation linéaire (Shashar *et al.*, 1996) et qu'ils possèdent un système visuel rhabdomérique dont les cellules sont sensibles à la lumière polarisée (Shashar & Cronin, 1996). Les motifs polarisés peuvent donc être impliqués dans les échanges entre céphalopodes (Cronin *et al.*, 2003 ; Boal *et al.*, 2004). De plus, la lumière polarisée réfléchiée par les iridophores n'est pas dépolariée quand elle passe à travers les chromatophores pigmentés, (Mäthger & Hanlon, 2006) ce qui suggère que même camouflés les individus pourraient utiliser ce type de communication. La possibilité de communiquer par le biais de la lumière polarisée a ainsi été qualifiée de « canal de communication caché » car les prédateurs des céphalopodes tels que les poissons téléostéens, les requins et les mammifères marins, ne seraient pas sensibles à la polarisation de la lumière et ne seraient donc pas en mesure de percevoir ce type d'information visuelle (Land & Nilsson, 2012 ; Mäthger & Hanlon, 2006). Chez *Sepia officinalis*, les motifs de polarisation se situent sur le devant de la tête, les bras et autour des yeux. Ils semblent avoir un rôle notamment lors de la reproduction (Shashar *et al.*, 1996 ; Boal *et al.*, 2004).

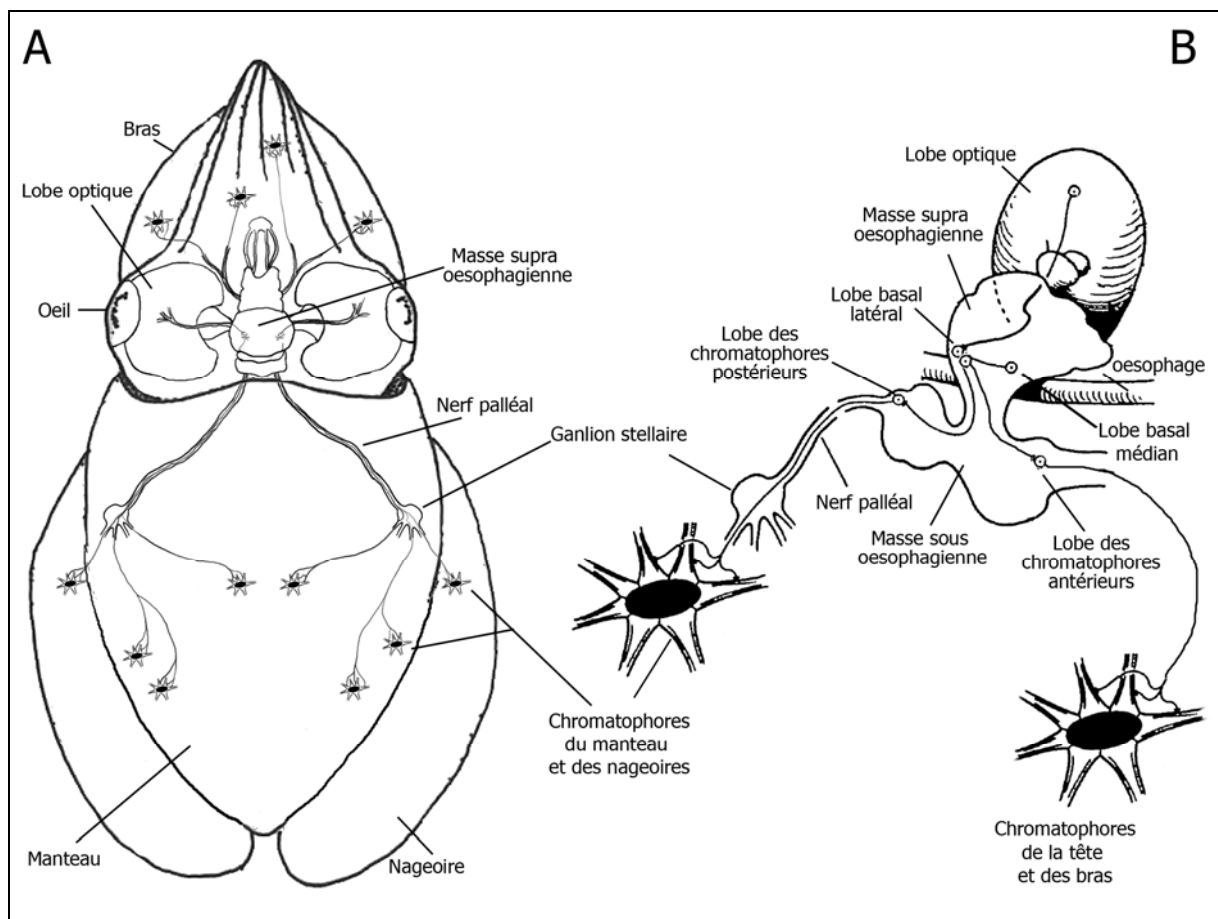
## 5. Contrôle et dynamique des changements colorés

### 5.1 Un contrôle essentiellement nerveux

Au niveau de la peau des Coléoïdes, les chromatophores, les iridophores, les leucophores et les muscles des papilles sont organisés avec précision les uns par rapport aux autres, non seulement morphologiquement mais aussi physiologiquement (Packard & Hochberg, 1977 ; Packard, 1982). Les motifs visibles à un moment donné sur la peau et la rapidité de changements de ces motifs sont en premier lieu le fait d'un contrôle nerveux précis et complexe de l'expansion des chromatophores par des motoneurones localisés au sein du cerveau (**Fig. 35A**). Ces neurones proviennent d'un champ de fibres motrices spécifiques de chromatophores (unités physiologiques) qui sont sélectionnés à partir de ce que Packard (1982) a décrit comme la matrice morphologique statique de l'organe chromatophore dans la peau. Un chromatophore ou un groupe de chromatophores peuvent participer à plus d'un composant, les unités physiologiques se chevauchant (Messenger, 2001).

Les iridophores ne sont pas non plus des structures colorées passives comme cela a été longtemps supposé (Messenger, 1979). L'iridescence peut être modifiée, *in vitro*, par l'application d'acétylcholine (ACh) activant des récepteurs muscariniques cholinergiques de la membrane plasmique des iridophores (Cooper *et al.*, 1990 ; Hanlon *et al.*, 1990 ; Mäthger *et al.*, 2004 ; DeMartini *et al.*, 2013). Récemment, DeMartini *et al.* (2013) ont proposé un mécanisme complet possible de modification de l'iridescence des iridophores. L'ACh se lie à un récepteur couplé à une protéine de type G (Cooper *et al.*, 1990). La protéine G est alors libérée et active une cascade de signalisation qui entraîne la libération de calcium à partir du réticulum endoplasmique (Mäthger *et al.*, 2004). Le Ca<sup>2+</sup> joue le rôle de second messenger, se liant à la calmoduline (Hanlon *et al.*, 1990) qui active des protéines kinases et phosphatases (DeMartini *et al.*, 2013). La phosphorylation et déphosphorylation

de réflectines spécifiques (Izumi *et al.*, 2010) conduisent à une sortie d'eau de la cellule et à une condensation des protéines leur donnant un aspect plus dense (Tao *et al.*, 2010). Cette déshydratation entraîne un changement dans la couleur de la lumière réfléchiée par augmentation de l'écart d'indice de réfraction entre les compartiments intra et extra-lamellaire (condensation de la protéine) mais aussi par une modification de la période du réflecteur multicouche (diminution de l'épaisseur des plaquettes). Wardill *et al.* (2012) ont mis en évidence la présence de ramifications neuronales au niveau des iridophores des nageoires et du manteau du calmar *Doryteuthis pealeii* qui pourrait permettre la diffusion des neurotransmetteurs. Mais il suggère aussi la présence d'un second mécanisme (non connu) qui pourrait être le résultat d'une activité musculaire, que ce soit au sein des iridophores ou dans la couche dermique à proximité (Wardill *et al.*, 2012). La dynamique de ces modifications semble relativement lente (plusieurs dizaines de secondes) par rapport à celles qui sont contrôlées par les chromatophores (fraction de seconde ; Wardill *et al.*, 2012).



**Figure 35. Représentation schématique de l'innervation des chromatophores chez les céphalopodes. B, d'après Dubas *et al.*, 1986.**

## 5.2 Le réseau du contrôle nerveux des chromatophores

L'adoption d'un motif dépend de la perception des paramètres de l'environnement donc de la vision. L'information visuelle issue des yeux est tout d'abord traitée dans chaque lobe optique, des commandes motrices sont ensuite élaborées et transmises aux centres moteurs intermédiaires et inférieurs du cerveau (lobes basaux et masse sous-œsophagienne, **Fig. 35B**). Chaque lobe optique projette l'information vers le lobe basal latéral sur le même côté du cerveau (l'ensemble du système est latéralisé). Le lobe basal latéral envoie l'information aux lobes des chromatophores antérieurs et postérieurs (Boycott, 1961). Les lobes des chromatophores antérieurs contiennent les motoneurones qui contactent les chromatophores de la tête et des bras, les lobes des chromatophores postérieurs contiennent les motoneurones des chromatophores du manteau. Pour les chromatophores du manteau, les motoneurones projettent leur axone par le nerf palléal puis par le ganglion stellaire situés du même côté (Messenger, 2001).

De nombreuses études de stimulation confirment l'organisation anatomique de ces lobes et suggèrent que le système moteur contrôlant la peau est organisé hiérarchiquement (Boycott, 1961 ; Messenger, 2001). Sur la base des données visuelles, les cellules du lobe optique sélectionneraient le motif corporel approprié, ensuite l'information de ce motif transite par le lobe basal latéral qui aurait pour rôle de veiller à ce que les deux côtés de l'animal ainsi que les parties antérieures et postérieures réagissent ensemble. Depuis les lobes basaux latéraux, l'information arrive dans les lobes des chromatophores antérieurs et postérieurs, où est située la majorité des motoneurones des chromatophores, dont les axones quittent le cerveau, pour rejoindre les chromatophores. Les nerfs moteurs des chromatophores stimulent des champs bien déterminés au sein de la peau (*Sepia officinalis* (Hanlon & Messenger, 1988), *Lolliguncula brevis* (Ferguson *et al.*, 1988), *Octopus vulgaris* (Froesch, 1973), *Eledone cirrhosa* (Dubas & Boyle, 1985) mais différentes études semblent démontrer qu'il n'y a pas de cartographie spécifique de ces motoneurones au sein des lobes des chromatophores (hypothèse de somatotopie ; Boycott, 1961 ; Dubas *et al.*, 1986 ; Gaston & Tublitz, 2006).

## 5.3 Les neurotransmetteurs impliqués dans le contrôle des chromatophores

La régulation des chromatophores est réalisée par l'intermédiaire de substances neuro-actives, dont trois sont connues actuellement : le L-glutamate, la sérotonine et les FaRPs. La contraction des muscles radiaires (donc l'expansion de la cellule pigmentaire) est réalisée par l'activité de nerfs excitateurs au L-glutamate (Messenger *et al.*, 1997 ; Loi & Tublitz, 2000). Les travaux de l'équipe de N. Tublitz ont montré que, chez *Sepia officinalis* un ensemble de petits peptides de la famille des FaRps (pour FMRFamide-related peptides) sont également impliqués dans le contrôle de la contraction des muscles des chromatophores (Loi *et al.*, 1996 ; Loi & Tublitz, 2000). Ces deux neurotransmetteurs semblent correspondre à deux cinétiques de contractions différentes, une voie neuronale « rapide » par l'intermédiaire du L-glutamate et une voie neuronale « lente » par l'intermédiaire des FMRF (Loi & Tublitz, 2000). Ces deux voies neuronales pourraient avoir un lien avec la différence observée entre

les espèces pélagiques et benthiques (ou necto-benthiques) qui seraient en lien avec leur mode de vie. Les seconds devant maintenir leurs chromatophores étendus pendant la journée pour leur permettre un camouflage efficace pourraient maintenir leur motif grâce aux FaRPs et réserver l'action du L-glutamate pour les changements rapides de motifs (Loi & Tublitz, 2000).

La rétraction des chromatophores est essentiellement provoquée par l'élasticité de la cellule pigmentaire et à la présence de microtubules au sein du compartiment pigmentaire. Toutefois la sérotonine (5-HT) serait impliquée dans la relaxation des muscles radiaux (Florey & Kriebel, 1969) et l'application de sérotonine sur la peau est le moyen expérimental le plus efficace pour couper instantanément les effets excitateurs du L-glutamate émanant des nombreuses synapses présentes le long des muscles radiaires (Reed, 1995 ; Messenger, 2001). Plusieurs études ont démontré ces effets chez un grand nombre de céphalopodes pélagiques, *Loligo vulgaris* et *Alloteuthis subulata* (Bone & Howarth, 1980), *Lolliguncula brevis* (Florey *et al.*, 1985). La sérotonine agirait sur la relaxation des muscles radiaires en agissant directement sur le stockage des ions Ca<sup>2+</sup> de ces mêmes cellules. Les muscles disposent de récepteurs membranaires à la sérotonine et sont capables de réagir à la diffusion de sérotonine par les nerfs qui les entourent étroitement au sein d'une même membrane basale (Reed, 1995).

**Si le fonctionnement du contrôle nerveux des chromatophores comme des iridophores commence à être mieux décrit et compris, la mise en place de ces structures nerveuses au cours du développement est méconnue. Les travaux que j'ai menés sur cette question chez *Sepia officinalis* sont présentés dans le paragraphe 1.4 de la partie 1 des résultats.**

## Problématique générale de la thèse

On vient de le voir tout au long de cette introduction, la couleur des animaux est un élément clé de l'interaction des organismes avec leur environnement et la diversité des motifs colorés existants s'explique par les mécanismes de la sélection naturelle (sélection de survie et/ou sélection sexuelle). Cette interaction avec l'environnement est très nettement visible chez les céphalopodes, où d'une espèce à l'autre, les ornements et les motifs réalisés trouvent une corrélation avec le mode de vie et le milieu de vie. Chez les céphalopodes Coléoïdes, chez qui les motifs ne sont pas fixes, deux mécanismes fondamentaux participent à l'élaboration des motifs :

- mécanisme 1 : le développement (embryonnaire et post-embryonnaire) qui permet la mise en place de l'ornementation tégumentaire spécifique de chaque espèce et la mise en place du réseau nerveux qui en permet le contrôle;

- mécanisme 2 : le contrôle nerveux des structures colorées qui permet à l'organisme de composer une très grande variété de motifs à chaque instant de sa vie et en fonction de son environnement.

C'est en agissant sur ces deux composantes que les pressions de sélection ont très vraisemblablement façonné la diversité des ornements et des motifs, que l'on considère cette diversité entre les espèces ou au sein même des espèces entre les juvéniles et les adultes.

Afin d'étudier les motifs colorés des céphalopodes dans une problématique évolutive (en comprendre l'apparition, la sélection et la diversité), j'ai souhaité par ce travail de thèse ouvrir le champ très peu exploré du développement (mécanisme 1). En effet, très peu d'études se sont penchées sur la mise en place avant l'éclosion des structures pigmentaires et de l'ornementation chez les Coléoïdes. Seules quelques études dynamiques ont été conduites sur les chromatophores des nouveau-nés d'*Octopus vulgaris* (Packard, 1985) ou sur la régénération des chromatophores chez des juvéniles de *Sepia officinalis* (Yacob *et al.*, 2011). Quant au développement des motifs colorés, eux-mêmes, ils ont été étudiés chez les juvéniles de *Sepia officinalis* (Hanlon & Messenger, 1988) et de *Loligo forbesi* (Gowland *et al.*, 2002) mais jamais au sein de l'embryon.

La seiche commune *Sepia officinalis* est une espèce necto-benthique à l'ornementation riche en chromatophores, iridophores et leucophores. La connaissance de son développement au sein de l'équipe de recherche mais aussi la maîtrise de technique comme l'hybridation *in situ* chez cette espèce, m'a permis d'entamer ce travail exploratoire et pionnier. **Ce manuscrit présente l'ensemble des travaux que j'ai entrepris afin d'approcher le développement des structures colorées et le développement de l'ornementation à l'éclosion grâce à différents outils, anatomique et moléculaire. J'ai fait le choix de présenter l'ensemble de mes résultats en les classant d'après les structures étudiées : les chromatophores dans une première partie, les iridophores dans la seconde. Dans la mesure où les leucophores ne se mettent seulement en place qu'après l'éclosion, je n'ai pas réalisé de travail spécifique sur cette structure tégumentaire.**

# **METHODOLOGIE**

---

# Modèle d'étude et Méthodologies employées

---

## 1. Le matériel biologique

### 1.1 Le modèle d'étude : la seiche

La seiche officinale, *Sepia officinalis*, vit sur les côtes Est de l'Atlantique (de l'Europe à l'Afrique) mais également en mer Baltique, en mer du Nord, en mer Méditerranée, et en Manche. Elle vit dans les eaux côtières et jusqu'au plateau continental (jusqu'à 200 mètres). Pour ma problématique et mon travail de thèse, cette espèce présente plusieurs intérêts notables :

- ***elle est une espèce necto-benthique.*** Cela signifie qu'elle vit à proximité du fond marin (benthos) mais qu'elle est également capable de se déplacer au sein de la colonne d'eau (necton). L'évolution de ce mode de vie est étroitement associée à la sélection d'une ornementation constituée d'une proportion importante de chromatophores (adaptés au camouflage) mais également d'iridophores. Son étude permet donc d'étudier le développement des trois structures à l'origine des couleurs des céphalopodes : les chromatophores, les iridophores et les leucophores;

- ***elle est une espèce migratrice qui pond dans les régions côtières*** (et en particulier sur les côtes normandes), ce qui permet un approvisionnement en œufs soit basé sur une récolte directe (à marée basse par exemple) soit basé sur la pêche de femelles fécondées maintenues en aquarium (voir partie 1.2). La disponibilité en œuf s'échelonne entre le printemps et l'été. Les seiches matures sexuellement (âgées alors de deux ans) pondent des grappes de 500 à 2000 œufs, dans des zones peu profondes sujettes aux marées. Les œufs sont alors accrochés un par un à un substrat, comme des herbes, des algues ou encore des paniers de pêcheurs;

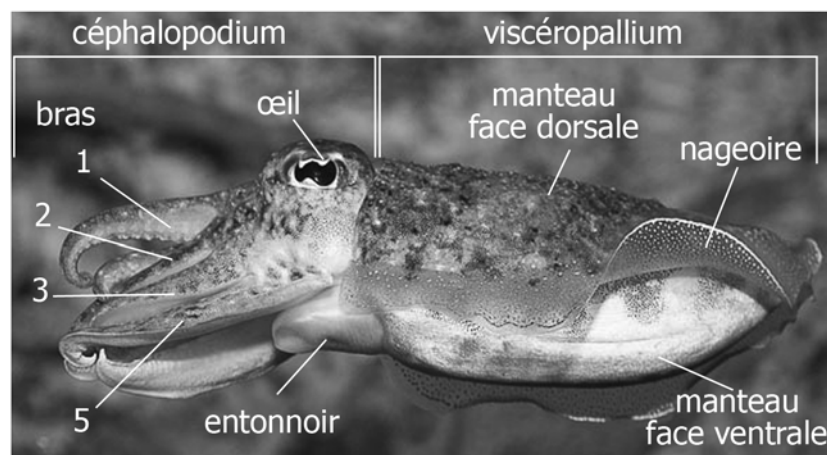
- ***les juvéniles sont semblables à l'adulte*** tant du point de vue morphologique que du mode de vie (necto-benthique). Ils sont issus, comme chez tous les céphalopodes, d'un développement direct : les capsules protègent un embryon unique dont le développement ne ressemble en rien au développement larvaire des autres mollusques. Les derniers stades de l'organogenèse (stades 24 à 30, Lemaire 1970) correspondent à une morphologie de juvénile. Ce sont pendant ces stades que la peau de l'embryon produit les structures colorées qui seront celles du futur juvénile. L'obtention d'embryons à ces stades a donc été une condition nécessaire à la réalisation de ce travail.

Les structures embryonnaires dans lesquelles sont susceptibles d'être produites des structures colorées sont les yeux et la peau. Nous distinguerons dans ce manuscrit, différentes parties anatomiques (**Fig. 36**) :



- **la tête** : elle correspond à la partie dénommée « céphalopodium » constituée de la tête à proprement parlé (bouche, organes sensoriels, cerveau) et des dix appendices péribuccaux dont deux tentacules (tous appelés bras chez l'embryon) qui constituent une couronne brachiale autour de la bouche ;

- **le manteau et l'entonnoir** : Ils correspondent à la partie dénommée « viscéropallium ». L'orientation utilisée dans ce manuscrit correspond à l'orientation dite « physiologique », adaptée au mode de vie et de déplacement de la seiche juvénile et adulte. La tête correspond à l'antérieur de l'animal, la pointe du manteau correspond au postérieur. La face de l'animal qui se pose sur le substrat sera dénommée « ventrale ». La face opposée, celle que l'on voit lorsque l'animal est posé sur le substrat, sera dénommée « dorsale ». Ainsi pour la tête comme pour le manteau, nous parlerons d'une face dorsale et d'une face ventrale. Les yeux, quant à eux, sont en position latérale et nous parlerons également de face latérale au niveau du manteau. Concernant les bras, ils ont une orientation bien particulière puisqu'ils sont organisés selon une symétrie radiale autour de la bouche. Nous distinguerons pour eux une face « buccale » -celle qui fait face à la bouche et qui est couverte de ventouses- d'une face « extérieure »- celle qui est visible de l'extérieur et sur laquelle se situe la plupart des structures colorées des bras. On pourra également être amené à distinguer les tentacules (bras 4) des autres bras dans la mesure où ils ne disposent de ventouses que sur la massue et ne montrent que peu de structures colorées. En dehors de leur propulsion pour la capture de proies, ces derniers sont en effet rétractés au sein de poches péribuccales, et sont donc non visibles de l'extérieur.



**Figure 36. Organisation anatomique de *Sepia officinalis* adulte.** Photo © Philip Colla, OceanLight.com.

## 1.2 L'origine des embryons et des tissus adultes employés et modes de fixation

Les œufs de *Sepia officinalis* sur lesquels nous travaillons sont soit issus de femelles sauvages capturées après fécondation et pondant dans les aquariums des stations marines de Luc-sur-mer

(Université de Caen, France) et de Roscoff (UPMC), soit issus du milieu naturel et récupérés sur des casiers de pêche, à partir du mois d'avril et ce jusqu'au mois de septembre. A leur arrivée à notre laboratoire, les œufs sont conservés dans l'eau de mer artificielle à 20°C et oxygénée par bulleur. Dans ces conditions, l'organogenèse se déroule sur 2 à 3 semaines. Des œufs sont alors quotidiennement disséqués et contrôlés de manière à assembler une collection complète des différents stades de développement morphologiques selon les étapes du développement établies par Lemaire (1970). Après avoir retiré la capsule et le chorion, les embryons sont fixés et traités pour l'hybridation *in situ* et l'extraction d'ARN.

Les embryons de *Loligo vulgaris* proviennent de plongées réalisées en méditerranée au niveau de Ain Tagourait (wilaya de Tipaza, Algérie), en juin 2009. Les embryons d'*Octopus vulgaris*, eux, proviennent de femelles ayant pondu à l'Aquarium de Monaco en août 2009. Quant aux tissus adultes de *Sepia officinalis* dont nous nous sommes servis, ils proviennent d'animaux morts issus de la pêche et ont été conservés à sec, à - 80°C.

- **en vue de l'extraction d'ARN totaux** : les embryons de *Sepia officinalis* (décapsulés et déchorionnés, des stades 20 à 30) ont été plongés dans du RNAlater® (Ambion) après une anesthésie par abaissement de la température sur de la glace et conservés à -20°C individuellement. Les embryons de *Loligo vulgaris* et *Octopus vulgaris* ont quand à eux, été conservés par grappe avec leur chorion du fait de leurs petites tailles.

- **en vue des hybridations *in situ*** : les embryons de *Sepia officinalis* (décapsulés et déchorionnés) ont été fixés à température ambiante dans du paraformaldéhyde à 3,7% pendant 2 à 3 heures (selon le stade) après une anesthésie par abaissement de la température sur de la glace. Après plusieurs rinçages en PBS, les embryons ont été placés dans du glycérol 30% / PBS pendant 2 heures et transférés dans du glycérol 50% une nuit à 4°C. Ils ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Plusieurs embryons pour chaque stade, allant du stade 20 au stade 30, ont été fixés et conservés individuellement.

### 1.3 L'extraction d'ADN et ARN, la synthèse d'ADNc et la RACE-PCR

L'extraction de l'ADN génomique a toujours été réalisée sur tissus adultes. Pour chaque extraction, environ 30mg de tissu du manteau de *Sepia officinalis* ont été utilisés. Le protocole d'extraction par colonnes d'affinité est celui du kit DNeasy Tissue de chez Qiagen. L'extraction d'ARN totaux a été réalisée sur des embryons (chez les trois espèces étudiées : *Sepia officinalis*, *Loligo vulgaris* et *Octopus vulgaris*), à chacun des stades chez *S. officinalis*. L'utilisation du Kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) seul ne me permettant pas d'obtenir des rendements optimaux à cause de la présence de lipides vitellins en grande quantité, un ajustement du protocole a été mis au point. Les embryons ont d'abord été broyés dans du Tri Reagent© (phénol, Euromedex) afin de supprimer au maximum ces lipides et d'obtenir un bon rendement. Après une centrifugation en présence de chloroforme, l'ARN a été purifié

à l'aide du Kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Pour les embryons de *Loligo vulgaris* et *Octopus vulgaris*, les extractions ont été réalisées sur un pool de cinq individus, du fait de leur petite taille, et du même stade, unique stade à notre disposition.

Concernant la synthèse d'ADNc, un pool d'ARN total provenant d'extraits d'ARN d'embryons de *Sepia officinalis* de différents stades (20-30) a été rétrotranscrits grâce au kit Omniscript® (Qiagen), afin de pouvoir réaliser des PCR classiques sur les ADNc obtenus. Les ARN totaux d'embryons de *Loligo vulgaris* et d'*Octopus vulgaris* ont également fait l'objet de rétrotranscriptions. Afin de réaliser des PCR RACE (Rapid Amplification of the cDNA Ends), des ARN totaux ont été rétrotranscrits grâce au kit GeneRacer™ (Invitrogen). Les ADNc ont été synthétisés à l'aide d'amorces oligo(dT) modifiées (GeneRacer™ Oligo(dT)) qui se lient à l'extrémité 3' des ARNm. Ces ADNc sont utilisés ensuite comme matrice pour l'amplification par PCR en présence de deux amorces. La première est spécifique du gène d'intérêt, alors que la seconde est universelle, car elle est complémentaire de la séquence ajoutée en 3' ou en 5' par le GeneRacer™ Oligo lors de la rétrotranscription des ARN.

#### **1.4 Les coupes au cryostat**

Afin d'obtenir des coupes transversales ou longitudinales passant au plus près du plan de symétrie des embryons, ceux-ci ont été inclus dans des blocs de gélatine, permettant ainsi d'orienter les embryons à notre gré. Les embryons ont été plongés dans un tampon de phosphate/saccharose/gélatine (tampon phosphate 0,12 M, saccharose 12%, gélatine 7,5%) et ensuite rapidement congelés dans de l'isopentane froid à -80°C. Ils ont été coupés en sections de 20 µm sur un cryostat Microm Microtech (HM560).

## **2. Le clonage des gènes d'intérêt**

Afin d'obtenir les séquences des différents gènes d'intérêt (réflectine, NOS, Tyrosinase, Notch, Delta, FMRF), j'ai dessiné des amorces spécifiques en me basant sur les contigs (tc) obtenus à partir d'une banque d'EST (Expressed Sequence Tag) établie à partir d'embryons du stade 16 au stade 28 (projet Genoscope CEA). Les séquences d'ADNc, codant pour les gènes d'intérêt, obtenus par PCR classique (BIOTAQ™ Red DNA Polymerase) ou PCR RACE ont été clonées dans le vecteur TOPO 4 (Invitrogen) et séquencées par GATC Biotech. Tous les alignements ont été réalisés avec le logiciel MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) et les calculs de pourcentage d'identité ont été effectués à l'aide de Jalview 2 (Waterhouse *et al.*, 2009).

## **3. L'analyse phylogénétique**

Afin de déterminer les relations phylogénétiques unissant les différentes réflectines nous avons réalisé des reconstructions phylogénétiques de cette famille en utilisant la méthode de maximum de vraisemblance avec 1000 répétitions aléatoires de « bootstrap ». Le modèle de substitution des caractères de la matrice a été déterminé par l'outil en ligne ProTest ([http://darwin.uvigo.es/software/protest2\\_server.html](http://darwin.uvigo.es/software/protest2_server.html)).

## 4. Les hybridations *in situ*

### 4.1 La synthèse des sondes ARN

Des sondes ARN ont été générées à partir des vecteurs contenant les produits de PCR, par transcription *in vitro* en utilisant des digoxigénine-11-UTP (Dig RNA labelling mix kit, Roche) ou de la FITC-12-UTP (fluorescein RNA labelling mix kit, Roche). Les sondes sens et anti-sens ont été obtenues avec la polymérase T3 ou T7 (Roche), en fonction du sens d'insertion du produit de PCR au sein du vecteur. Les sondes ont été purifiées par précipitation à froid avec du chlorure de lithium et de l'alcool anhydre. Les sondes sens ont été utilisées comme témoins négatifs.

### 4.2 L'hybridation *in situ* simple avec révélation au NBT-BCIP

Afin de déterminer les patterns d'expression des différents gènes étudiés, j'ai adapté le protocole d'hybridation *in situ* à notre modèle : l'embryon de *Sepia officinalis*. Différentes durées de perméabilisation, d'imprégnation et différents types et durées de rinçage ont été testés en fonction des stades afin d'obtenir un protocole donnant le minimum de bruit de fond. Certaines zones de l'embryon sont plus sensibles que d'autres, comme la coquille, les yeux, et les sinus. Les différents tests m'ont permis d'aboutir au protocole suivant (voir détails dans l'**annexe A1**):

Toutes les hybridations *in situ* (ISH) ont été réalisées sur au moins 3 embryons par stade et des contrôles négatifs ont été effectués pour chaque stade. Toutes les étapes ont été réalisées à température ambiante, sauf indication contraire. Après des rinçages en PTW (PBS, 0,1% de Tween 20), les embryons ont été perméabilisés à l'aide de la protéinase K (10µg/ml dans PTW durée en fonction du stade) et post-fixés dans du PFA 3,7%. Les embryons ont ensuite été pré-hybridés pendant 6 heures à 65°C dans la solution d'hybridation (SH) (50% de formamide désionisé, 5X SSC, 0,1% de Tween 20, 1% de SDS) contenant 25µg/ml l'héparine et 100µg/ml d'ARNt (Roche). L'hybridation avec les sondes d'ARN (300ng/ml) a été effectuée dans le tampon d'hybridation (SH, 33µg/ml héparine, 400µg/ml ARNt) à 65°C pendant la nuit. Les sondes non hybridées ont été éliminées par 4 lavages en SH, un en SSC 2X 25% en SH, un en SSC 2X 50% en SH, un en SSC 2X 75% en SH, un en SSC 2X, chacun de 10 minutes à 65°C. Tous les tampons de lavage ont été préchauffés à 65°C.

Les sondes hybridées ont été détectées par un anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline (Roche). Après une étape de saturation avec 4% de blocking reagent (Roche) et 15% de sérum de veau fœtal dans du MABT (acide maléique 100mM et NaCl 150mM, pH 7,5, 1% Tween 20) pendant 1 heure à température ambiante, les embryons ont été incubés une nuit à 4°C avec des anticorps dilués au 1:2000 dans du MABT contenant 1% de blocking reagent (Roche) et 5% de sérum de veau fœtal. Les embryons ont été lavés six fois dans du MABT pendant 10 minutes, et les anticorps liés ont été révélés en utilisant du NBT-BCIP (Roche) dans du tampon AP (Tris-HCl 100mM pH 9,5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween 20) fraîchement préparé et contenant 1mM

levamisol, à température ambiante pendant 3 heures. La réaction a été arrêtée par lavage avec le PTW. Les embryons ont été post-fixés 24 heures à 3,7% PFA en PBS.

#### **4.3 L'hybridation *in situ* simple avec révélation fluorescente**

J'ai adapté le protocole d'hybridation *in situ* à l'utilisation de sondes-Dig-UTP couplées à la tyramide, de manière à réaliser des révélations fluorescentes et à s'abstraire ainsi des révélations violacées au NBT-BCIP qui peuvent se confondre avec les pigments des chromatophores (protocole cf. **annexe A2**). L'hybridation et les lavages sont les mêmes que ceux décrits précédemment, mais les sondes ARN ont été détectées par les anticorps anti-digoxigénine couplés à la POD (Roche). Certaines étapes supplémentaires sont nécessaires tel que l'inactivation de l'activité peroxydase endogène du fait de l'utilisation de la POD. Cette inactivation a été faite par incubation dans du PTW avec du peroxyde d'hydrogène à 3% pendant 30 minutes à température ambiante. Après un lavage dans du MABT pendant 5 minutes, une étape de saturation avec 4% de blocking reagent (Roche) et 15% de sérum de veau fœtal dans du MABT pendant 1 heure à température ambiante a été réalisée. Les embryons ont été ensuite incubés pendant une nuit à 4°C avec des anticorps dilués à 1:500 dans du MABT contenant 1% de blocking reagent (Roche) et 5% de sérum de veau fœtal. Les embryons ont été lavés trois fois dans PTW pendant 10 minutes, et les anticorps liés ont été révélés à l'aide de FITC-tyramide (synthétisé au laboratoire, protocole en annexe A3) dilué à 1:200 dans PTW contenant du peroxyde d'hydrogène 0,001% à température ambiante pendant 45 minutes dans l'obscurité. La réaction a été arrêtée par lavage dans une solution de PTW et les embryons ont été post-fixés 24 heures dans du PFA à 3,7% dans du PBS.

#### **4.4 L'hybridation *in situ* double avec révélation fluorescente sur coupes**

Afin de détecter l'expression de certains gènes à l'échelle cellulaire, j'ai adapté un protocole de double hybridation fluorescente sur coupe (Braissant & Wahli, 1998). Ces hybridations ont été réalisées sur des coupes de 20µm coupées au cryostat.

L'hybridation *in situ* (ISH) a été réalisée en utilisant des coupes à différents niveaux de 3 embryons (stade 26) dans des expériences indépendantes (protocole cf. **annexe A3**). Les contrôles ont été effectués pour chaque manipulation. Les coupes ont été incubées pendant 2 x 15 minutes dans du PBS contenant 0,1% de DEPC actif (Sigma), puis imprégnées pendant 15 minutes dans SSC 5X. Les coupes ont ensuite été pré-hybridées pendant 2 heures à 65°C dans le tampon d'hybridation (formamide 50%, SSC 5X, l'ADN de sperme de saumon 40µg/ml, 5X Denhardt reagent, 10% de sulfate dextran). Les deux sondes testées (la sonde-Dig et la sonde-FITC) ont été ajoutées au tampon d'hybridation (chaque 300ng/ml). L'hybridation a été réalisée à 65°C pendant la nuit. La préhybridation et l'hybridation ont été réalisées dans une chambre humide saturée avec une solution de 50% formamide / SSC 5X afin d'éviter l'évaporation. Après incubation, les coupes ont été lavées pendant 30 minutes en SSC 2X, 1 heure en SSC 2X, 1 heure dans SSC 0,1X à 65°C. Toutes les solutions de lavage ont été préchauffées à 65°C. L'inactivation de l'activité peroxydase endogène a été réalisée en PTW avec du peroxyde d'hydrogène à 3% pendant 30 minutes à température

ambiante. Après un lavage en tampon MABT pendant 5 minutes, une étape de saturation avec 4% de blocking reagent (Roche) et 15% de sérum de veau fœtal dans du MABT pendant 1 heure à température ambiante a été réalisée. Ensuite, les coupes ont été incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps anti-digoxigénine couplé à la POD (Roche) dilué à 1:500 dans du tampon MABT contenant 1% de blocking reagent (Roche) et 5% de sérum de veau fœtal. Les coupes ont été lavées trois fois dans du PTW pendant 10 minutes, et les anticorps liés ont été révélés à l'aide Cy3-tyramide dilué au 1:200 dans du PTW contenant 0,001% de peroxyde d'hydrogène à température ambiante pendant 45 minutes, dans l'obscurité. Les prochaines étapes se sont déroulées dans l'obscurité. La révélation a été arrêtée et toute activité peroxydase résiduelle a été stoppée par lavage dans PTW avec du peroxyde d'hydrogène à 3% pendant 30 minutes. Après une nouvelle étape de saturation de 1 heure, l'incubation avec l'anticorps anti-FITC couplé avec le POD, a été réalisée pendant une nuit à 4°C. Après élimination par lavage des anticorps non liés, l'étape de la deuxième révélation a été réalisée avec de la FITC-tyramide dilué au 1:200 dans du PTW contenant du peroxyde d'hydrogène 0,001% à la température ambiante pendant 45 minutes. Après lavage, les coupes ont été montées dans du Mowiol.

## **5. L'expérimentation sur embryons vivants**

Pour chaque manipulation d'embryons vivants (suivi de l'apparition de l'iridescence et des chromatophores), les embryons (décapsulés et déchorionnés) ont été placés dans de l'eau de mer filtrée et ont été tranquilisés par le froid (lit de glace sous la cupule de suivi) afin de minimiser leur stress. Des embryons vivants ont été décapsulés et déchorionnés à différents stades de développement, afin d'observer et de suivre l'apparition des pigments au sein des chromatophores. Ces embryons ont été placés en tube individuel en présence d'eau de mer et à l'obscurité. Néanmoins, il s'est avéré qu'au bout de deux jours, les embryons ainsi manipulés présentaient des malformations et ne survivaient pas. Le suivi a donc été réalisé sur des embryons différents à différents stades. La mise à mort des embryons à la fin de l'observation a été réalisée par endormissement au froid (en chambre froide).

## **6. L'immunomarquage**

Les cryo-coupes d'embryons ont été lavées dans du PBS et ensuite immergées dans un tampon de blocage (PBS / 1% de sérum albumine bovine) pendant 30 min à température ambiante, pour réduire les liaisons non spécifique. Les coupes ont ensuite été incubées pendant 2 h à température ambiante avec un anticorps polyclonal commercial produit chez le lapin (contre un FMRamide tetrapeptide synthétique; Labomics SA, Nivelles, Belgique) dilué à 1:4000 dans le tampon de blocage (Ac1). Après plusieurs étapes de lavage en PBS, une seconde incubation avec un anticorps biotinylé anti-IgG de lapin (Ac2) a été réalisée pendant une nuit à 4°C dans le tampon de blocage (dilution 1:100). Après les étapes de lavages supplémentaires dans du PBS, la coloration a été réalisée en utilisant le kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) et du 3,3-

diaminobenzedine (Kit DAB-nickel, SK-4100, Vector Laboratories). Après 10 minutes, la coloration a été arrêtée dans du PBS.

Pour tester la spécificité de l'anticorps, une expérience de contrôle a été effectuée sur des coupes successives d'un embryon au stade 26. Ces coupes ont été mises en contact avec l'anticorps Ac1 préalablement incubé dans des conditions particulières. Pour le témoin positif, l'anticorps Ac1 a été incubé à 4°C pendant 4 heures avec une solution de FMRF (Proteogenix) ou de FLRF (Proteogenix) à  $10^{-4}$ M. Les coupes traitées avec ces anticorps n'ayant pas montré de signal, nous en avons déduit que les anticorps ont bien été inactivés par la présence des peptides. Pour le témoin négatif, l'anticorps Ac1 a été incubé à 4°C pendant 4 heures avec une solution de sérotonine (Sigma, St. Louis, MO, USA) à  $10^{-4}$ M. Les coupes traitées avec cet anticorps ont montré une forte coloration dans différentes parties du cerveau en développement. Ces résultats suggèrent donc que l'anticorps que nous avons utilisé est bien spécifique aux FaRPs.

## 7. Les coupes semi-fines

Afin de suivre la mise en place des différentes structures tégumentaires au cours du développement, des coupes semi-fines ont été réalisées. Des prélèvements de tissus ont été effectués sur différentes parties du corps d'embryon du stade 20 à l'éclosion. Pour chaque stade, un prélèvement a été effectué au niveau du bord du manteau dorsal, sur le manteau latéral, au niveau du manteau ventral et au niveau des bras. Nous avons utilisé le protocole de fixation et d'inclusion de Djediat et Boukroufa (1990) qui est adapté aux tissus issus d'organismes marins (protocole cf. **annexe A4**). Les coupes semi-fines de 0,5 à 1µm ont été réalisées sur un ultra microtome LKB 8800 Ultratome III puis colorées au bleu de toluidine avant d'être observées au microscope.

## 8. L'observation et l'imagerie

Les embryons ont été observés avec un stéréomicroscope Leica M16 binoculaire 2F et les coupes ont été observées avec un microscope Leica DMLB. Les images en couleur ont été réalisées avec une caméra couleur Coolsnap et les images en fluorescence ont été faites avec une caméra noir et blanc, Qimaging Retiga 2000R et colorisées dans Adobe Photoshop CS. Pour la photographie d'échantillons ayant un relief conséquent (comme un embryon par exemple), une série d'images a été prise à différents focus et le logiciel Helicon Focus (HeliconSoft) a été employé pour compiler les seules zones de netteté en une seule image.

# RESULTATS



---

# Partie 1

## Etude des chromatophores chez *S. officinalis* : aspects développementaux et génétiques

---

Les chromatophores sont les éléments essentiels des variations de couleur chez *Sepia officinalis*. Ils sont présents en grande quantité chez la seiche juvénile, 400-500 par mm<sup>2</sup>, avant une diminution de leur nombre chez l'adulte, 35-50 par mm<sup>2</sup>, en lien avec le changement opéré dans leur comportement, notamment le passage du statut de proie potentielle (utilisation accrue du camouflage) à celui de prédateur (Hanlon & Messenger, 1988). Le développement des chromatophores n'a encore jamais été étudié au cours du développement embryonnaire des céphalopodes.

Je présenterai dans cette partie, ma démarche, les résultats que j'ai obtenus ainsi que les conclusions directes que nous avons pu en tirer. Certains de ces travaux ont fait l'objet de publication (**article n°1**, **article n°5**), d'autres, encore en cours, seront poursuivis au delà de cette thèse et seront développés comme « perspectives » dans des paragraphes dédiés. L'exploration dans ce domaine a été conduite à différentes échelles pour différents objectifs :

▶ à l'échelle de l'organisme :

**1.1** : décrire la dynamique d'apparition des pigments des chromatophores au cours de l'embryogenèse

**1.2** : connaître les mécanismes de distribution qui sous-tendent la mise en place du réseau de chromatophores

▶ à l'échelle moléculaire :

**1.3** : déterminer la nature chimique des pigments des chromatophores

**1.4** : définir des marqueurs moléculaires permettant le suivi de la mise en place des chromatophores

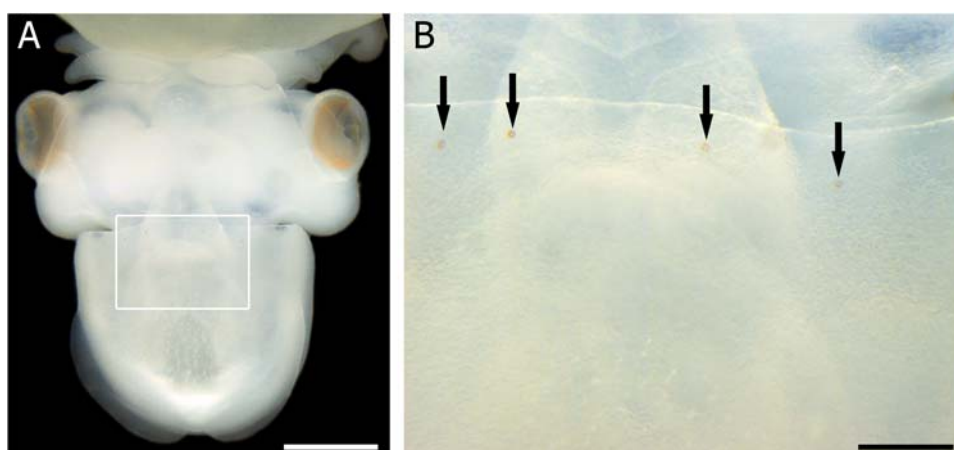
## 1.1 La dynamique d'apparition des pigments des chromatophores dans l'embryon de *S. officinalis*

Nous avons décidé de suivre l'apparition de tâches pigmentées au niveau de la peau de l'embryon pour obtenir une première idée de la dynamique d'apparition et de différenciation des cellules pigmentaires, les chromatophores. Des embryons vivants à différents stades de développement, ont été libérés de leur capsule puis ont été observés sous une loupe binoculaire en condition d'éclairage classique. Dans la mesure où la survie des embryons en dehors de leur chorion et de leur capsule est limitée, il nous est impossible de suivre la dynamique d'apparition des chromatophores sur un même individu et donc de suivre l'évolution individuelle des chromatophores. La dynamique que je décris ici est donc une reconstitution réalisée grâce à différents embryons à différents stades.

Des coupes semi-fines ont également été réalisées pour identifier la localisation précise des chromatophores au sein de la peau au cours du développement et évaluer leur position au regard de ce qui est connu chez l'adulte.

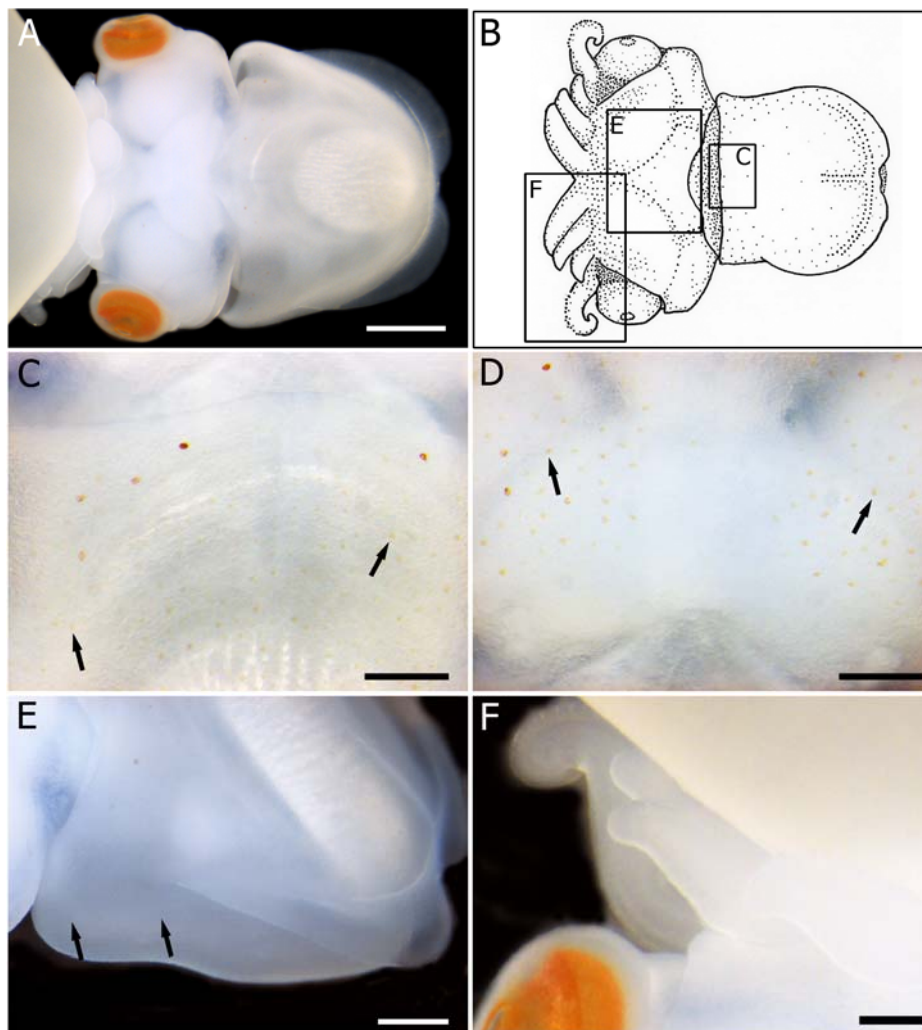
Au cours du développement, deux cinétiques d'apparition ont été observées en fonction de la face de l'embryon. Je décrirai donc l'apparition de ces pigments en fonction de la face dorsale et de la face ventrale du manteau quelle que soit la région du corps (tête, bras ou manteau).

Sur la face dorsale de l'embryon : les premiers pigments apparaissent en bordure du manteau, sur la face dorsale, au stade 25. Quatre premiers chromatophores (flèches) apparaissent orange pâle de manière symétrique par rapport à la ligne médiane (**Fig. 37A-B**). Ce sont les chromatophores pigmentés à ce stade.



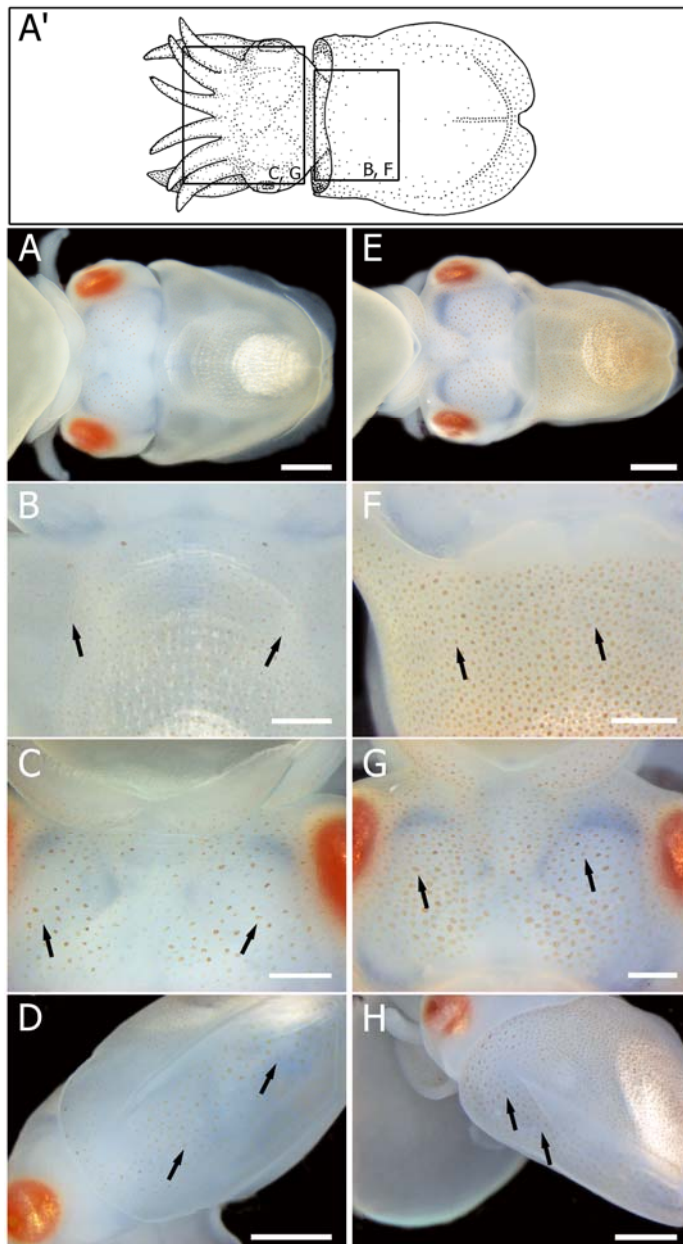
**Figure 37. Distribution des chromatophores pigmentés de la face dorsale d'un embryon vivant au stade 25, observé sous loupe binoculaire après retrait de la capsule. A, embryon entier. B, agrandissement d'une partie du manteau, les flèches indiquent les chromatophores pigmentés. Barres d'échelle : A = 1mm; B = 300µm.**

Au stade suivant, la totalité de la face dorsale du manteau est recouverte de chromatophores présentant une pigmentation orangée avec une densité autour de 130 chromatophores par  $\text{mm}^2$ . Les quatre premiers chromatophores présentent une couleur plus intense (Fig. 38A-F). A partir de ce stade, des chromatophores pigmentés sont aussi présents sur la partie latérale du manteau située sous les nageoires (Fig. 38E). Dans cette zone la densité est plus faible (autour de 55 chromatophores par  $\text{mm}^2$ ). J'ai aussi observé à ce stade les premiers pigments apparaître sur le dessus de la tête avec une densité en chromatophores autour de 110 par  $\text{mm}^2$  (Fig. 38D). Aucun pigment n'est visible au niveau des bras (Fig. 38F).



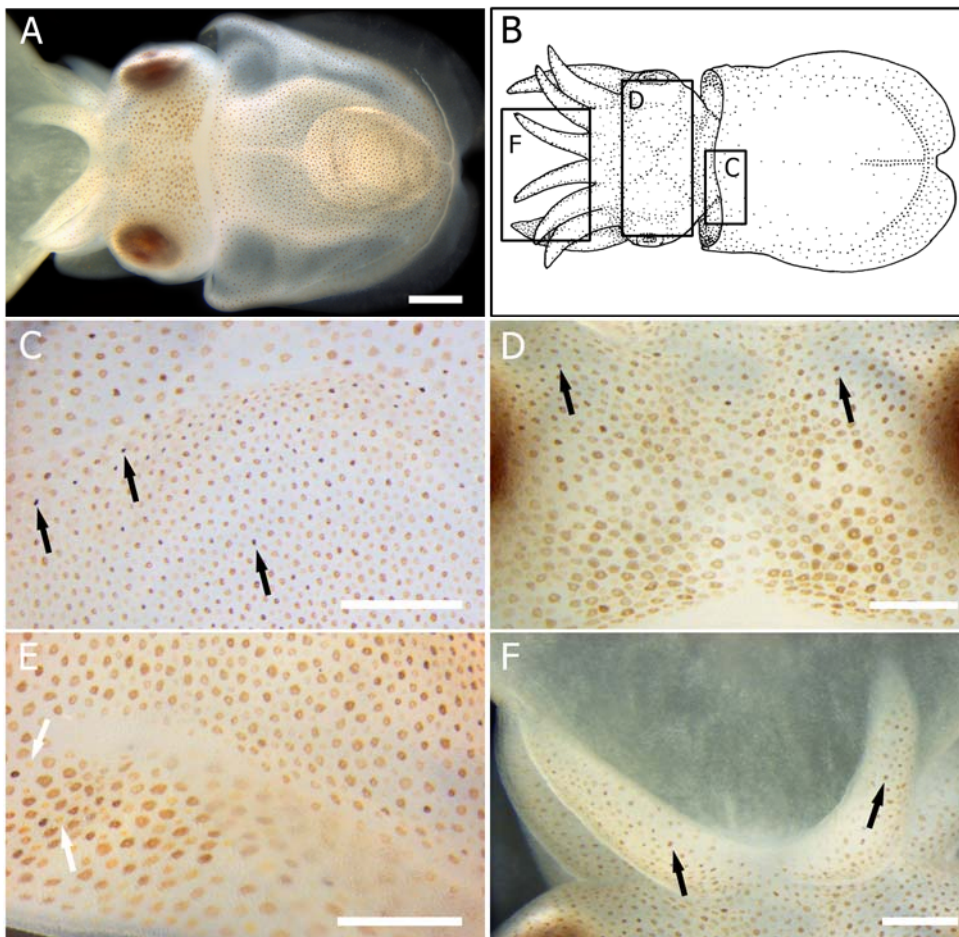
**Figure 38. Distribution des chromatophores pigmentés de la face dorsale d'un embryon vivant au stade 26,** observé sous loupe binoculaire après retrait de la capsule. **A**, embryon entier. **B**, représentation schématique du stade et visualisation des zones d'agrandissement. **C**, agrandissement d'une partie du manteau. **D**, agrandissement d'une partie de la tête. **E**, vue latérale du manteau. **F**, agrandissement de la partie gauche de la couronne des bras. Les chromatophores pigmentés sont indiqués par les flèches. Barres d'échelle : **A** = 1mm ; **C**, **E**, **F** = 300 $\mu\text{m}$  ; **D** = 500 $\mu\text{m}$ .

Au stade 27, l'augmentation de la densité en chromatophores orangés est observable sur toute la surface dorsale de l'embryon (**Fig. 39A**), le manteau : autour de 180 chromatophores par  $\text{mm}^2$  (**Fig. 39B**), la partie latérale : autour de 60 chromatophores par  $\text{mm}^2$  (**Fig. 39D**) et la tête : autour de 100 chromatophores par  $\text{mm}^2$  (**Fig. 39C**). A ce stade, les premières cellules pigmentées apparaissent à la surface des bras avec une densité d'environ 160 chromatophores par  $\text{mm}^2$  (**Fig. 39C**). Au stade 28, le nombre de chromatophores pigmentés augmente en densité (**Fig. 39E**), le manteau atteint environ 310 chromatophores par  $\text{mm}^2$  (**Fig. 39F**), la partie latérale environ 90 par  $\text{mm}^2$  (**Fig. 39H**), la tête environ 160 par  $\text{mm}^2$  (**Fig. 39G**) et les bras environ 240 par  $\text{mm}^2$  (**Fig. 39G**).



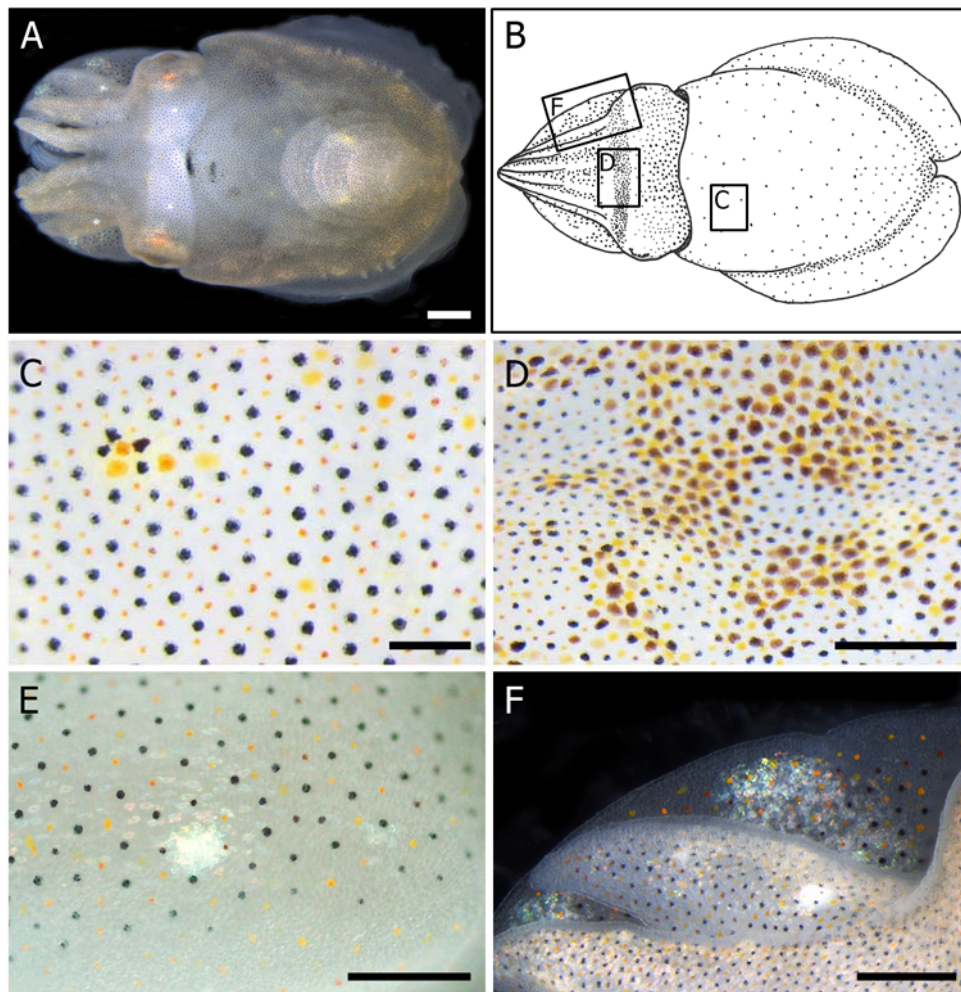
**Figure 39. Distribution des chromatophores pigmentés de la face dorsale d'embryons vivants aux stades 27 et 28, observés sous loupe binoculaire après retrait de la capsule. A', représentation schématique des stades et visualisation des zones d'agrandissement. A-D, stade 27 ; E-H, stade 28. A, E, embryons entiers. B, F, agrandissements d'une partie du manteau. C, G, agrandissements d'une partie de la tête. D, H, vues latérales du manteau. Les chromatophores pigmentés sont indiqués par les flèches. Barres d'échelle : A, D, E, H = 1mm ; B, C, F, G = 500µm.**

A partir du stade 29, une différence de couleur commence à apparaître entre les chromatophores quelle que soit la partie du corps observée (manteau, **Fig. 40A, C** ; tête, **Fig. 40D** ; bras, **Fig. 40F**) : certains apparaissent nettement plus foncés que les autres (flèches noires). De plus, quelques chromatophores jaunes apparaissent entre les chromatophores plus foncés sur les côtés latéraux du manteau (**Fig. 40E**, flèches blanches). Ce sont donc en tout trois grandes catégories de couleurs qui se distinguent au stade 29 : les orangés, les brun-noirs et les jaunes. Cette différenciation n'est pas aussi évidente au niveau de la tête et des bras. En plus de la différenciation en couleur des chromatophores, il y a aussi une augmentation de la densité avec environ 440 chromatophores par  $\text{mm}^2$  au niveau du manteau, environ 220 par  $\text{mm}^2$  au niveau de la tête et au niveau des bras. Au niveau de la partie latérale la densité en chromatophores reste constante, environ 90 par  $\text{mm}^2$ .



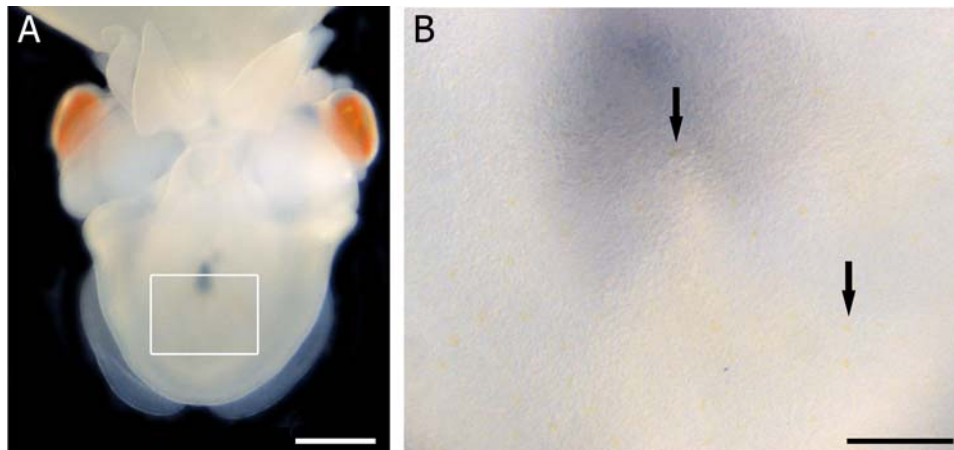
**Figure 40. Distribution des chromatophores pigmentés de la face dorsale d'un embryon vivant au stade 29,** observé sous loupe binoculaire après retrait de la capsule. **A**, embryon entier. **B**, représentation schématique du stade et visualisation des zones d'agrandissement. **C**, agrandissement d'une partie du manteau. **D**, agrandissement d'une partie de la tête. **E**, agrandissement du côté latéral du manteau. **F**, agrandissement de la couronne des bras. Barres d'échelle : **A** = 1mm ; **B**, **C**, **D**, **E** = 500 $\mu\text{m}$ .

Au stade 30, la différence de couleurs entre les chromatophores devient manifeste : les noirs, les jaunes et les orangés (qui virent même au rouge-orangé) se distinguent clairement et semblent s'organiser suivant un agencement non aléatoire (Fig. 41). Cette différenciation est tout aussi visible sur le manteau (Fig. 41C) et la partie latérale (Fig. 41E) qu'au niveau de la tête (Fig. 41D) et des bras (Fig. 41F). La densité en chromatophores reste sensiblement la même au niveau du manteau, autour de 450 chromatophores par  $\text{mm}^2$ , et au niveau de la partie latérale, autour de 90 chromatophores par  $\text{mm}^2$ , mais augmente au niveau de la tête, autour de 300 chromatophores par  $\text{mm}^2$  et au niveau des bras, autour de 280 par  $\text{mm}^2$ .



**Figures 41. Distribution des chromatophores pigmentés de la face dorsale d'un embryon vivant au stade 30,** observé sous loupe binoculaire après retrait de la capsule. **A**, embryon entier. **B**, représentation schématique du stade et visualisation des zones d'agrandissement. **C**, agrandissement d'une partie du manteau. **D**, agrandissement d'une partie de la tête. **E**, agrandissement du côté latéral du manteau. **F**, agrandissement de la partie droite de la couronne des bras. Barres d'échelle : **A** = 1mm ; **C**, = 150 $\mu\text{m}$ ; **D**, **E**, **F** = 500 $\mu\text{m}$ .

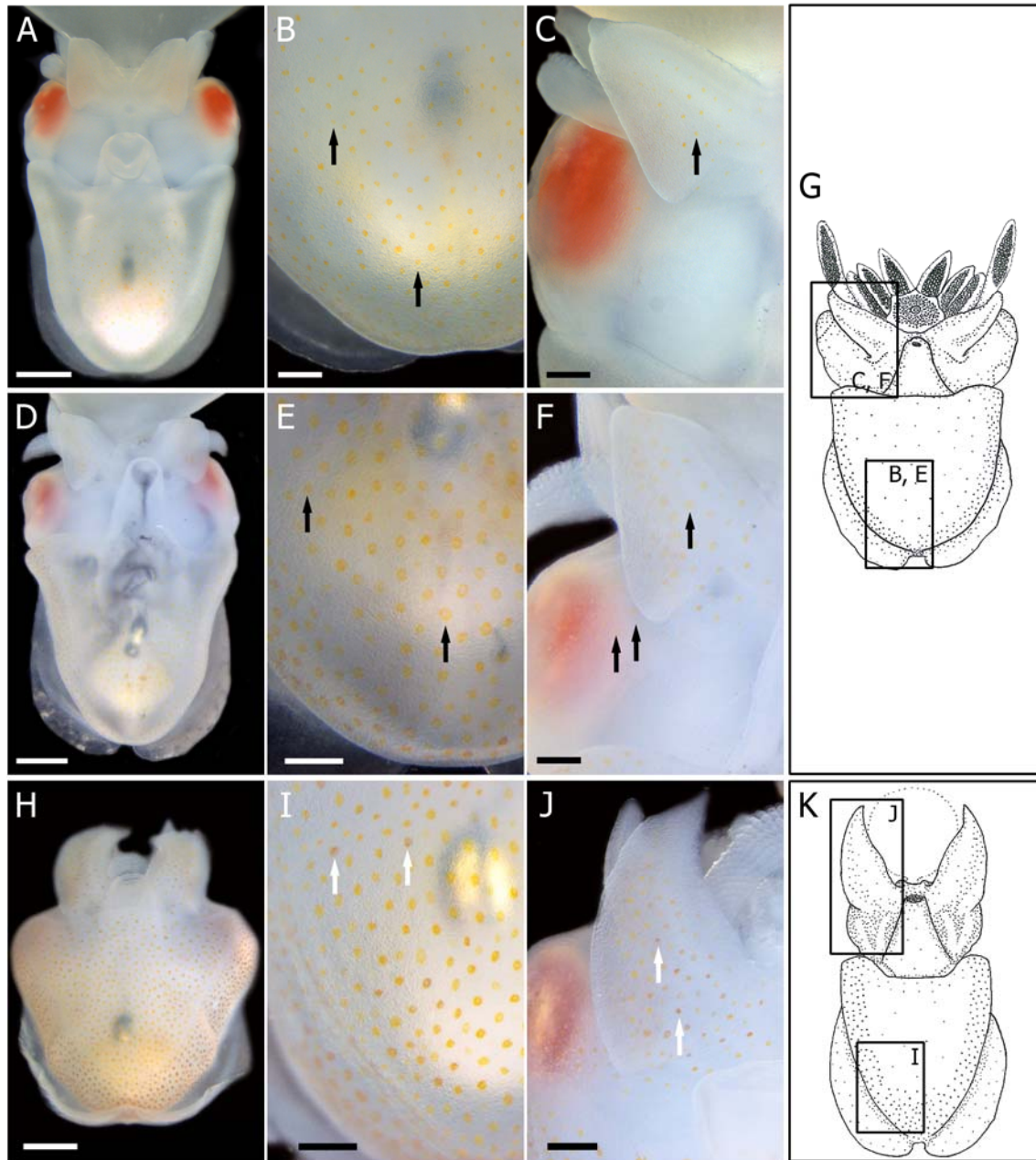
Sur la face ventrale de l'embryon : la cinétique de pigmentation des chromatophores est différente de celle de la face dorsale (**Fig. 42**). Les premiers pigments apparaissent, à un stade de décalage par rapport aux chromatophores de la face dorsale, c'est à dire au stade 26. Une très légère coloration jaune (flèche noire) apparaît dans les chromatophores sur toute la surface du manteau (**Fig. 42A-B**).



**Figure 42. Distribution des chromatophores pigmentés de la face ventrale d'un embryon vivant au stade 26**, observé sous loupe binoculaire après retrait de la capsule. **A**, embryon entier. **B**, agrandissement d'une partie du manteau. Barres d'échelle : **A** = 1mm ; **B** = 300 $\mu$ m.

Aux stades suivants (27-28), la coloration devient plus intense (**Fig. 43A-F**) et les chromatophores semblent plus gros et moins nombreux par rapport à la face dorsale de l'embryon. Au stade 27, les chromatophores de la face ventrale mesurent environ 40 $\mu$ m de diamètre alors que ceux de la face dorsale ne semblent mesurer que 30 $\mu$ m. Au stade 28, les chromatophores semblent plus dilatés sur la face ventrale mais il est difficile de déterminer le degré d'étirement de la cellule. La densité en chromatophores, autour de 40 chromatophores par mm<sup>2</sup>, n'évolue pas entre ces deux stades. Les premiers chromatophores pigmentés apparaissent sur la face ventrale des bras 5 au stade 27 (environ 25 sur la surface totale du bras, **Fig. 43C**) puis augmentent en nombre au stade 28 (environ 40 sur la surface totale du bras, **Fig. 43F**). A ce stade, quelques chromatophores pigmentés apparaissent sur la peau de la tête.

Au stade 29, les chromatophores pigmentés sont plus denses sur la totalité de la face ventrale de l'embryon (**Fig. 43H-J**), avec une densité autour de 60 chromatophores par mm<sup>2</sup> au niveau du manteau (**Fig. 43I**) et autour de 80 chromatophores sur la surface totale des bras 5 (**Fig. 43J**). Certains chromatophores présentent une coloration brunâtre (indiqués par les flèches blanches), au niveau du manteau (**Fig. 43I**) mais aussi au niveau des bras et de la tête (**Fig. 43J**).

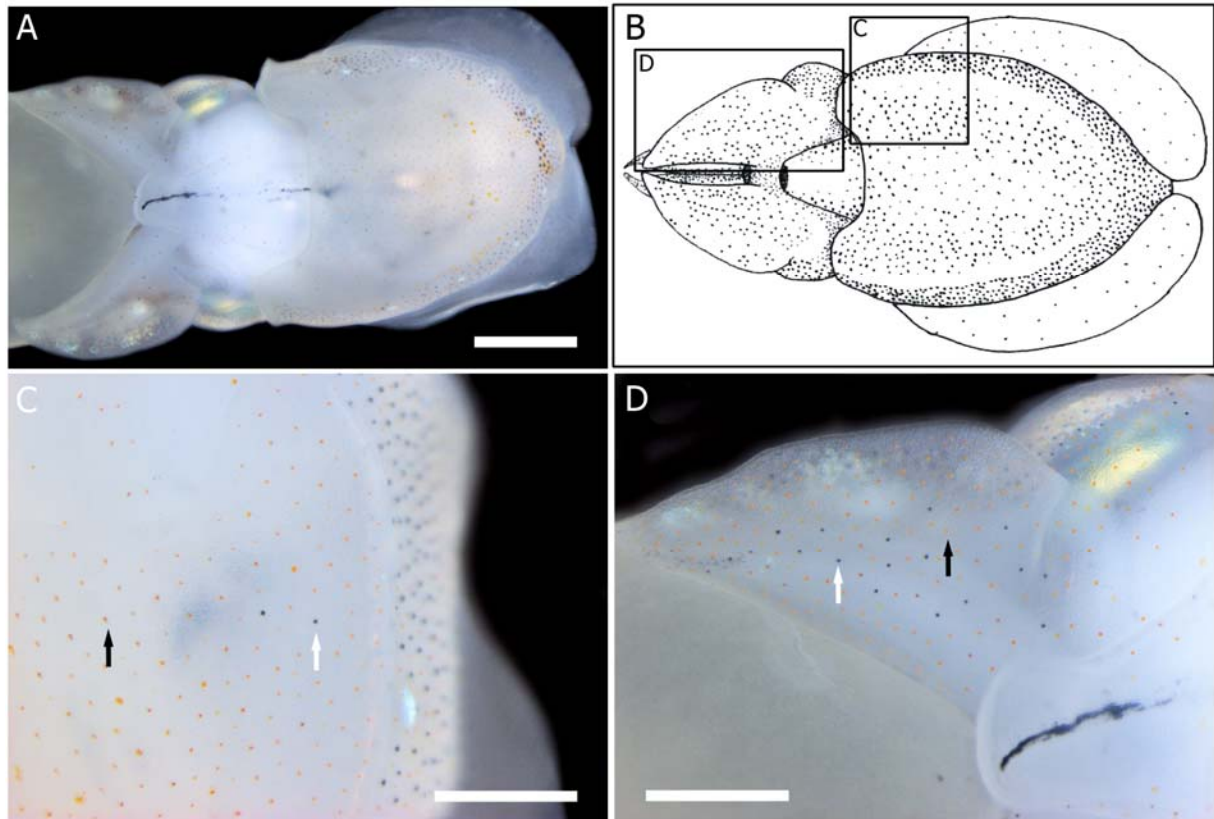


**Figure 43. Distribution des chromatophores pigmentés de la face ventrale d'embryons vivants**, observé sous loupe binoculaire après retrait de la capsule. **A-C**, stade 27 ; **D-F**, stade 28 ; **H-J**, stade 29. **G**, **K**, représentation schématique des différents stades et visualisation des zones d'agrandissement. **A**, **D**, **H**, embryons entiers. **B**, **E**, **I**, agrandissements d'une partie du manteau. **C**, **F**, **J**, agrandissements d'une partie de la tête et du bras cinq. Les flèches noires indiquent la présence de chromatophores, les flèches blanches indiquent les chromatophores brunâtres. Barres d'échelle : **A**, **D**, **H** = 1mm ; **B**, **C**, **E**, **F**, **G**, **I** = 300µm.

Au stade 30, la face ventrale du manteau présente essentiellement des chromatophores jaune-orangés. Quelques chromatophores brun-noirs sont présents mais de façon éparse (indiqués par des flèches blanches, **Fig. 44**). La densité en chromatophores reste inchangée, environ 40 chromatophores par mm<sup>2</sup> ce qui est nettement moins que sur la face dorsale : environ 450 chromatophores par mm<sup>2</sup> (**Fig. 44C**). Une limite nette est visible entre la partie ventrale et la partie



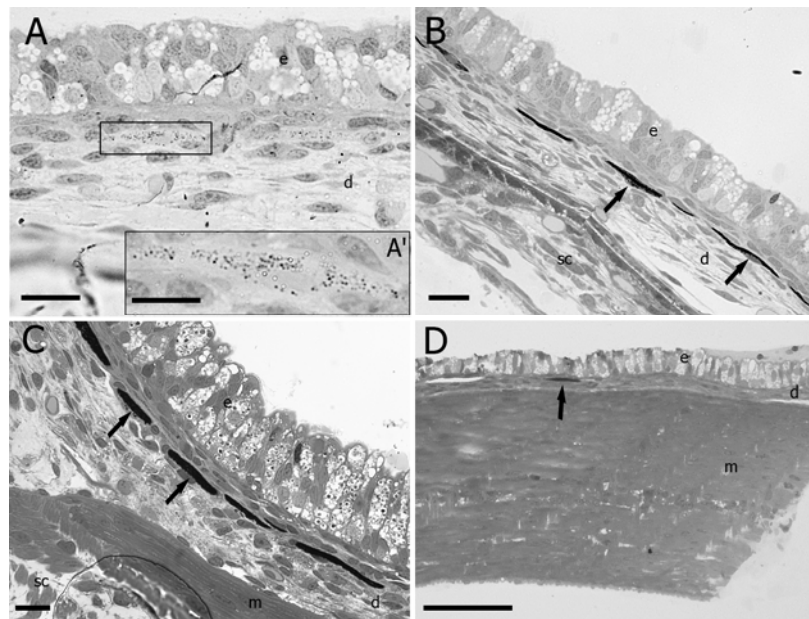
latérale du manteau qui, elle, présente la même dynamique que la face dorsale du manteau (**Fig. 44C**). Au niveau des bras, la densité est autour de 40 chromatophores par mm<sup>2</sup> et la proportion en chromatophores foncés semble plus importante que sur le manteau (**Fig. 44D**).



**Figure 44. Distribution des chromatophores pigmentés de la face ventrale d'un embryon vivant au stade 30,** observé sous loupe binoculaire après retrait de la capsule. **A**, embryon entier. **B**, représentation schématique du stade et visualisation des zones d'agrandissement. **C**, agrandissement d'une partie du manteau. **D**, agrandissement d'une partie de la tête et du bras cinq. Les flèches noires indiquent la présence de chromatophores, les flèches blanches indiquent les chromatophores foncés. Barres d'échelle : **A** = 2mm ; **C**, **D** = 1mm.

Les coupes semi-fines transversales ont montré que les chromatophores se développent bien au niveau du derme, à l'endroit même de leur position finale chez le juvénile et chez l'adulte (**Fig. 45**). Au cours du développement, il est possible d'observer l'augmentation de la densité en chromatophores sur la face dorsale du manteau (**Fig. 45A, B, C**), leur faible densité en face ventrale (**Fig. 45D**), mais aussi l'augmentation du nombre des granules de pigments au sein des chromatophores. Néanmoins, ces observations ne nous permettent pas de déterminer s'il existe ou non des pigments différents au sein d'un même chromatophore. L'observation de coupes ultra-fines en microscopie électronique,

pourrait nous apporter plus de détails sur la mise en place de cette structure cellulaire aux différents stades.



**Figure 45. Coupes semi fine sur embryon de *Sepia officinalis*.** A, B, C, Coupes transversales d'une portion de peau de la face dorsale du manteau. A, stade 25 ; B, stade 27 ; C, stade 30. A', agrandissement d'un chromatophore. D, coupe transversale d'une portion de peau de la face ventrale du manteau au stade 30. Les chromatophores sont indiqués par des flèches noires sauf pour A où le chromatophore est encadré. Barres d'échelle : A, B, C = 20 $\mu$ m ; A' = 10 $\mu$ m ; D = 100 $\mu$ m. Abréviations : d, derme ; e, épithélium ; m, muscle, sc, sac coquillier.

### Interprétation et discussion

La dynamique d'apparition des chromatophores ou plutôt l'apparition des pigments au cours du développement suit deux cinétiques différentes en fonction de la face de l'embryon considérée. Sur la face dorsale de l'embryon, ce sont d'abord des pigments orange pâle qui apparaissent dans quatre chromatophores, puis une vague de pigmentation gagne les chromatophores sur toute la surface dorsale avec un léger décalage dans le temps entre le manteau, la tête et les bras. Les couleurs rouge-orangé, bruns-noirs et jaunes apparaissent tardivement (stade 29). En face ventrale, ce sont d'abord des chromatophores jaunes qui apparaissent, rejoints plus tard (au stade 30) par des chromatophores orangés et brun-noirs.

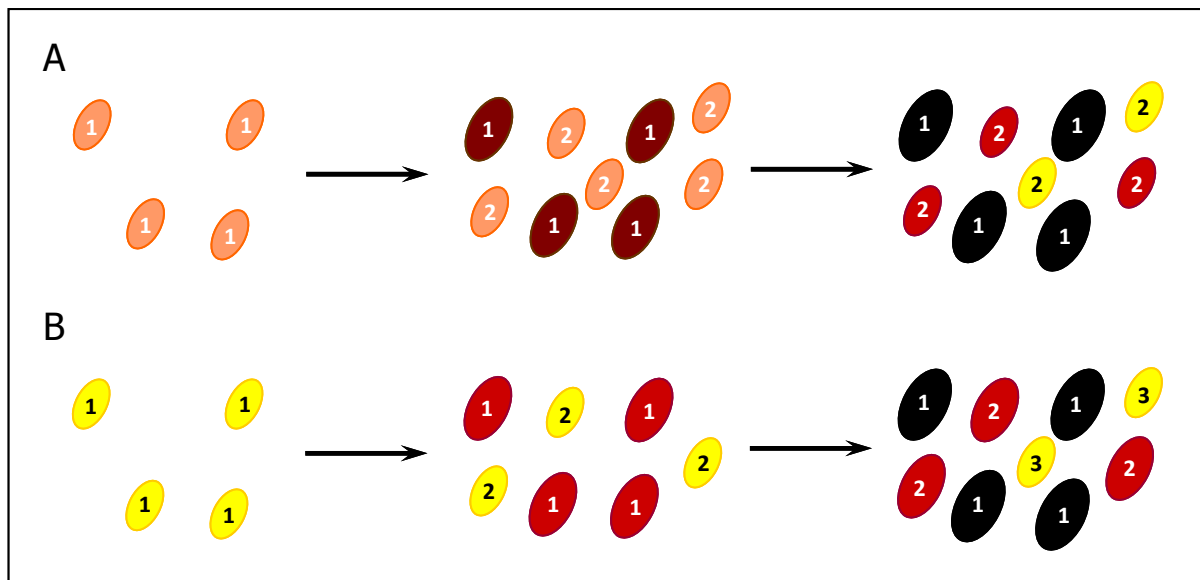
Deux hypothèses simples peuvent expliquer la diversité et l'évolution des couleurs chromatophores au sein de la peau des céphalopodes:

- soit les chromatophores sont spécialisés de leur formation jusqu'à leur mort et ne produisent qu'une unique couleur. Ils sont donc invariants au cours du temps (hypothèse d'invariance).

Suivant un tel mécanisme, il faut nécessairement l'apparition de différents types de chromatophores pour créer une diversité de couleurs.

- soit les chromatophores, au cours de leur développement, produisent d'abord une certaine couleur et peuvent ensuite être amenés à changer au cours du temps (hypothèse de maturation).

Les travaux sur la nageoire en régénération du juvénile de *S. officinalis* (Yacob *et al.*, 2011) comme les travaux chez les juvéniles d'*Octopus vulgaris* (Packard *et al.*, 1985) montrent que le développement post-embryonnaire des chromatophores suit davantage un processus de maturation. Chez la seiche, en effet, tous les chromatophores apparaissent d'abord orange pâle puis acquièrent leur couleur finale avec le temps : noir, rouge-orange, jaune (Fig. 46A). Les futurs chromatophores noirs apparaissent en premier et augmentent en taille en même temps qu'ils s'assombrissent alors que les chromatophores jaunes et rouge-orangés, qui arrivent dans un second temps, sont plus petits et n'augmentent jamais en taille. Chez *Octopus*, il s'agit également de maturation mais la couleur des chromatophores semble aussi liée à leur « âge » : tout chromatophore commence sa « vie » en jaune, puis deviendra orange, puis rouge et finira brun-noir (Fig. 46B). Les nouveaux chromatophores, jaunes et plus petits, apparaissent systématiquement entre les chromatophores existants, plus gros et qui ne sont plus jaunes (Packard *et al.* 1985).



**Figure 46. Représentation schématique de l'apparition des chromatophores pigmentés. A,** lors de la régénération de la nageoire de *Sepia officinalis*, d'après Yacob *et al.* (2011). **B,** chez le juvénile d'*Octopus vulgaris*, d'après Packard *et al.* (1985).

La méthode que nous avons employée pour suivre le développement des chromatophores au cours de l'embryogenèse ne nous permet pas de suivre individuellement chaque chromatophore. Dès

lors, il nous est difficile de savoir quelle hypothèse est la plus vraisemblable chez l'embryon de *S. officinalis*. Par exemple, les chromatophores dorsaux jaunes qui apparaissent au stade 29 sont-ils de nouveaux chromatophores ou sont-ils des chromatophores orangés ayant changé de couleur (hypothèse de maturation) ? Le fait, qu'en face ventrale, les premiers chromatophores qui apparaissent soient jaunes nous indique qu'il est possible chez *S. officinalis* de développer des chromatophores directement jaunes comme c'est le cas du mécanisme décrit chez *Octopus* (Packard et al. 1985). La même question peut se poser concernant les chromatophores noirs qui apparaissent de façon massive dorsalement au stade 29 : s'agit-il de nouveaux chromatophores ou s'agit-il de chromatophores orangés ayant évolués (hypothèse de maturation) ? Si l'on s'en réfère aux deux études connues, l'hypothèse de maturation semble être la plus probable.

Enfin, s'ajoute à la difficulté de suivi individuel des chromatophores, la difficulté de bien discriminer clairement les différentes classes de couleurs pigmentaires : lorsque les chromatophores sont relâchés, la concentration des pigments rendent très proches les classes jaunes et rouge-orangés.

## 1.2 La recherche des mécanismes de distribution du réseau des chromatophores

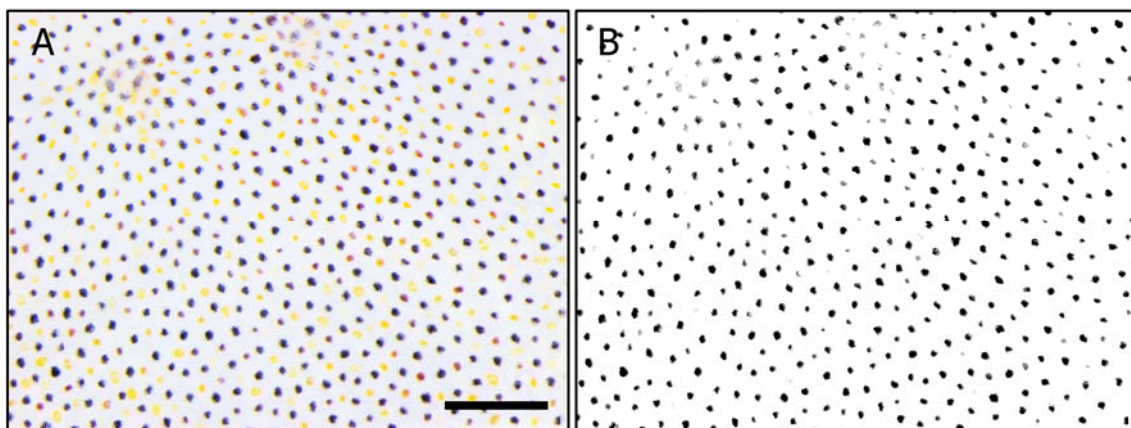
Lors de l'observation de la mise en place des chromatophores sur la face dorsale du manteau au cours du développement, il semblerait que l'apparition d'un chromatophore par rapport à un autre ne soit pas due au hasard. Nous avons voulu tester si cette distribution pouvait correspondre à un modèle mathématique qui puisse traduire les mécanismes moléculaires sous jacents. L'élaboration du modèle a été réalisée par Martin Rossi (étudiant ingénieur de Polytechnique), et nous avons procédé à des analyses mathématiques sur des photos du manteau (face dorsale) de dix embryons au stade 30. Une partie de ces résultats a été publié dans l'article n° 5.

### Première étape : étude par la fonction de Ripley

Avant toutes analyses numériques, des analyses d'images ont été effectuées afin de pouvoir en extraire les coordonnées du centre de chaque chromatophore et de les analyser par traitement statistique (**Fig. 47**).

#### *Analyse d'image*

Pour des raisons techniques, deux classes de chromatophores ont été définies, les chromatophores clairs et les chromatophores foncés. Le jaune et le orange ont des plages RVB qui se recouvrent fortement de même que le brun et le noir. Les écarts entre ces nuances sont au-delà du pouvoir de résolution de la méthode. Les images utilisées n'ayant pas été calibrées, les distances sont exprimées en unité arbitraire (pixel) dans toutes les analyses suivantes.



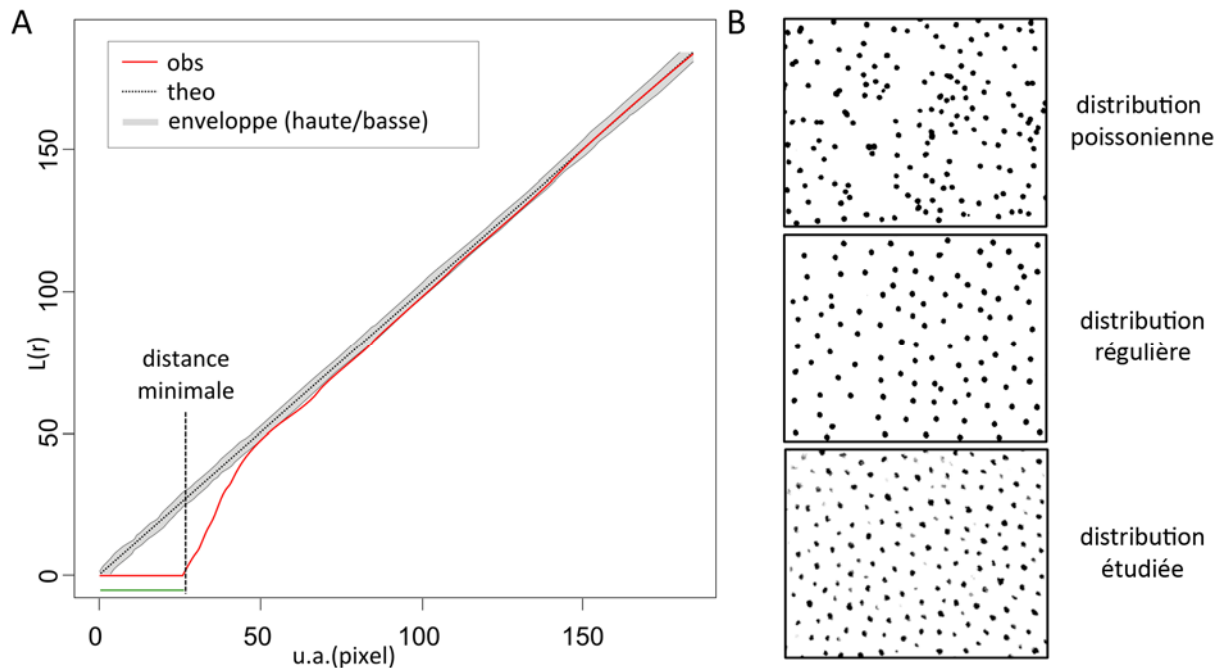
**Figure 47. Traitement d'image d'une partie de la face dorsale du manteau.** A, image avant traitement, les pigments jaunes, rouge-oranges, bruns et noirs sont visibles ; B, image après filtrage des seuls chromatophores foncés (brun et noirs) sont visibles. Barres d'échelle = 300µm.

Il nous a été difficile d'isoler, de la même manière, les chromatophores clairs car leurs gammes RVB se confondent avec la couleur du corps de la seiche, empêchant de les discriminer grâce à une fonction seuil. Nous n'avons travaillé qu'à partir des chromatophores foncés. Les coordonnées obtenues ont été traitées par plusieurs outils, le logiciel R pour la fonction de Ripley (R. D. C. Team, 2010) et Scilab pour les autres analyses (Consortium scilab, 2010).

#### *La fonction de Ripley*

La fonction K de Ripley est utilisée pour comparer le motif ponctuel observé avec un motif ponctuel engendré par un processus connu, ici un processus de Poisson (aléatoire) homogène. Elle est la distribution cumulative des fréquences d'observations à une distance donnée point par point, ou à l'intérieur d'une classe de distances. C'est parce qu'elle préserve les distances à toutes les échelles que la statistique de Ripley peut quantifier l'intensité du motif à de multiples échelles.

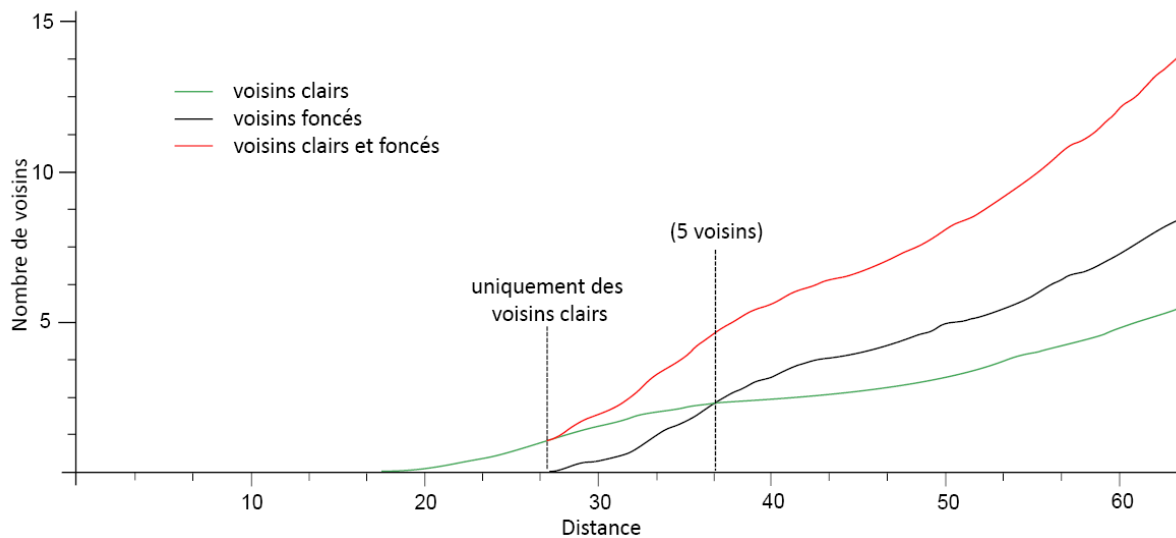
Plus précisément, la fonction L qui est définie comme suit  $L(r) = \sqrt{\frac{K(r)}{\pi}}$  a été tracée, où r est la distance, K(r) la fonction K de Ripley. Cette fonction est basée sur la distribution des chromatophores foncés d'une partie du motif du côté dorsal du manteau (**Fig. 47B**). Le tracé suivant comporte la fonction L de la distribution en rouge (obs) ainsi que le processus de Poisson en noir pointillé (theo) (**Fig. 48**). Dans un processus aléatoire homogène comme le processus de Poisson  $K(r) = \pi r^2$  quel que soit r, donc  $L(r) = r$ . Une enveloppe de fonctions L obtenues à partir de 20 motifs aléatoires générés (distribution de poisson de la même intensité que le modèle observé) est également tracée (enveloppe, zone grisée). Une fonction de Ripley en-dessous des bornes de l'enveloppe traduirait une régularité du motif liée à une répulsion entre les chromatophores. Inversement une courbe au-dessus de l'enveloppe correspondrait à une agrégation (voir une attraction) des chromatophores. La fonction L du motif des chromatophores observée est nettement sous le processus de Poisson pour les petites distances, indiquant donc une régularité du motif et suggérant ainsi **l'existence d'un phénomène de répulsion entre les chromatophores pendant l'ontogénèse**. De même ce tracé montre qu'il existe une distance minimale entre chaque chromatophore. Pour de longues distances, la courbe rejoint une distribution de Poisson, ce qui signifie que la distribution des chromatophores devient aléatoire.



**Figure 48.** Tracé de la fonction L de la distribution des chromatophores foncés observés sur la face dorsale du manteau d'un embryon au stade 30 (A). **obs**, fonction L observée ; **theo**, processus de poisson. B, illustration des différents types de distribution, d'après Chessel, 1978.

#### Deuxième étape : l'étude du nombre de voisins

Cette analyse permet de déterminer pour un chromatophore, le nombre de voisins dans un rayon d'une valeur donnée. Cette analyse a été effectuée afin d'étudier le voisinage d'un chromatophore foncé en fonction des autres chromatophores foncés mais aussi en fonction des chromatophores clairs. Les deux classes de chromatophores (clairs et foncés) ont donc d'abord été traitées séparément puis l'ensemble des données a permis d'étudier les voisins de chaque chromatophore. Pour chaque chromatophore foncé dans la zone centrale de l'image, le nombre de voisins appartenant à chaque classe a été compté. Les courbes représentent le nombre moyen de voisins dans un rayon d'une valeur donnée (**Fig. 49**). Avant un rayon minimal (ici 20 u.a.  $\approx 75\mu\text{m}$ ), un chromatophore n'a pas de voisin, ce qui est cohérent avec ce qui a été observé avec la fonction de Ripley. Ensuite, dans un rayon légèrement plus grand, les premiers voisins d'un chromatophore foncé rencontrés sont des chromatophores clairs (courbe verte). Il faut atteindre un rayon qui inclut cinq voisins pour qu'un chromatophore foncé soit entouré d'autant de chromatophores clairs que de chromatophores foncés. Au-delà de cinq voisins les chromatophores foncés sont prédominants. Ce résultat a montré que la position respective des chromatophores clairs et foncés n'était pas aléatoire, indiquant **l'existence d'un second phénomène de répulsion qui interviendrait dans le déterminisme de la couleur des chromatophores voisins.**



**Figure 49. Nombre de voisins d'un chromatophore foncé.** En vert, le nombre moyen de voisins clairs ; en noir, le nombre moyen de voisins foncés ; en rouge, le nombre moyen à la fois de voisins clairs et de voisins foncés d'un chromatophore.

### Interprétation et discussion

La répartition des chromatophores n'est clairement pas aléatoire. Elle semble répondre à **deux phénomènes de répulsion** : chaque chromatophore semble inhiber le développement d'un autre chromatophore dans un certain rayon autour de lui mais également semble empêcher les chromatophores dans un rayon légèrement plus grand d'adopter la même teinte. Aucun gène n'a encore été identifié chez les céphalopodes qui pourrait expliquer la répartition stricte des chromatophores mais cette répulsion à courte distance peut faire penser à un processus réaction-diffusion mais aussi à un processus d'inhibition latérale telle que celle résultante par exemple de l'action du système Notch/Delta (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995).

Nous avons voulu tester l'éventuelle implication du système Notch-Delta dans la peau de *S. officinalis* en développement. Les gènes *notch* et *delta* codent tous les deux pour des récepteurs transmembranaires capables de se lier l'un à l'autre. Une cellule produisant plus de Delta que ses voisines provoquera chez celles-ci une inhibition de leur propre voie Delta (via une voie de transduction liée à Notch). Rapidement, une boucle d'amplification se met en place, et des cellules adjacentes initialement identiques peuvent adopter des destins différents. La cellule ayant produit initialement un peu plus de Delta que ses voisines (sous l'influence d'une voie de différenciation particulière) se retrouvera la seule à s'engager dans cette différenciation. Ce mécanisme d'inhibition latérale a initialement été découvert au sein des organes sensoriels de la drosophile où seule une cellule finit par adopter un destin proneural (Simpson, 1997). Un tel mécanisme, basé sur la voie Notch, pourrait également exister dans le cas de la différenciation des chromatophores. Les cellules



progénitrices des différents types cellulaires qui composent les chromatophores pourraient donc présenter un taux de Delta plus élevé que les cellules dermiques voisines.

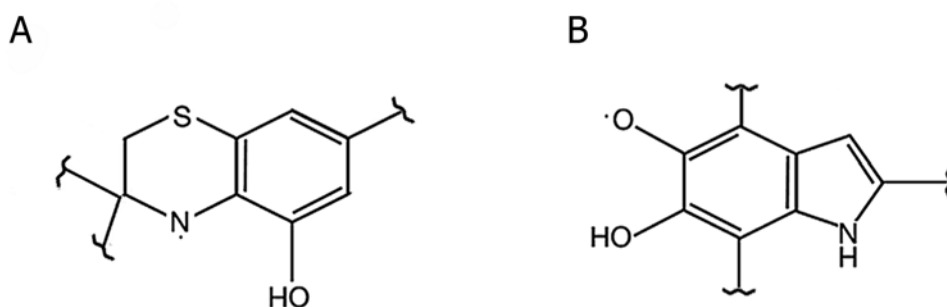
Afin de rechercher la séquence de *delta* chez *Sepia officinalis*, des amorces ont été synthétisées à partir de la séquence de *delta* d'*Euprymna scolopes*. Des amplifications par PCR ont été réalisées sur l'ADNc obtenu à partir d'un pool d'ARN d'embryon de *S. officinalis* aux différents stades de l'organogénèse avec les amorces Delta-F11 (5'-TTGCAGCAGTATTTCCCATTC-3', IAAVYPI) et Delta-R11 (TGGACCATGTGCGAGTGGTGT-3', WTMSSV) correspondant aux nucléotides 26 à 423 de la séquence de Delta d'*E. scolopes*. Après clonage et séquençage des produits de PCR, nous avons obtenu une séquence de 397 nucléotides (séquence cf. **annexe A5**). Afin de déterminer si Delta joue un rôle dans le déterminisme cellulaire de chromatophores, une sonde ARN anti-sens a été synthétisée à partir de l'ADNc de la séquence *delta* obtenue afin d'effectuer des hybridations *in situ*. Malheureusement les premiers résultats n'ont pas permis d'observer de signal. L'expérience doit être renouvelée. Une recherche du gène *notch* chez *S. officinalis* a aussi été entreprise, mais pour le moment ne nous a pas permis d'aboutir à l'obtention d'une séquence.

La recherche de processus de communication entre cellules au sein de l'épiderme et du derme reste un domaine d'étude complexe. En particulier, les chromatophores sont des structures pluricellulaires. Leur développement peut donc à la fois relever de phénomènes d'inhibition ou de répulsion (pour ce qui concerne leur répartition) mais aussi de processus d'attraction (en ce qui concerne le recrutement de cellules myogéniques autour de la cellule pigmentaire centrale). Notre recherche (infructueuse à l'heure actuelle) des facteurs Notch-Delta au sein de la peau n'est donc que la première étape d'un champ de recherche plus vaste.

### 1.3 La recherche de la nature des pigments des chromatophores

Dans ce paragraphe sont regroupés les résultats se rapportant à notre recherche d'identification des pigments des chromatophores de *Sepia officinalis*. En particulier, nous avons cherché à confirmer (ou infirmer) la présence de mélanines au sein des cellules pigmentaires. La nature chimique des pigments des chromatophores des Coléoides, n'est en effet pas clairement établie. Si la présence d'ommochromes est admise depuis longtemps (Linzen, 1976), une étude effectuée sur la peau de *Sepia officinalis* adulte a démontré la présence d'au moins trois pigments différents, des ommochromes, sans toutefois aboutir à la détermination précise de ceux-ci (Van den Branden & Declair, 1976). Un travail d'identification des ommochromes est actuellement en cours au sein de l'équipe. Par ailleurs, la présence chez *Octopus vulgaris* et *Sepia officinalis* de chromatophores noirs laisse penser que des mélanines sont probablement produites (Fox & Crane, 1942). Cependant, cette hypothèse n'a jamais été confirmée. Afin d'apporter quelques éléments de réponse, une étude préliminaire des pigments d'embryon de seiche à l'éclosion a été menée en collaboration avec Fabienne Peyrot et Yves Frapart du laboratoire de Chimie et Biochimie Toxicologiques et Pharmacologiques de l'université Paris Descartes (UMR 8601). Cette collaboration s'est appuyée sur l'utilisation de la technique de résonance paramagnétique électronique (RPE), particulièrement adaptée à la détection d'espèces radicalaires dont font partie les mélanines.

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une technique de spectroscopie qui repose sur l'interaction entre un champ magnétique et un moment magnétique permanent d'origine électronique. Cette technique a pour cible les espèces chimiques paramagnétiques (ou centres paramagnétiques), c'est-à-dire des atomes ou des molécules qui possèdent des électrons non appariés, comme les radicaux (ex : HO $\cdot$ ,  $\cdot$ NO,  $\cdot$ NO $_2$ ) ou encore les métaux de transition (ex : Cu $^{II}$ , Fe $^{II/III}$ , Mn $^{II}$ ...). Les mélanines (tout comme certains ommochromes) présentent des radicaux (**Fig 50**) et peuvent être analysées en RPE.



**Figure 50. Structures probables des radicaux inclus dans la phéomélanine (A) et l'eumélanine (B).** Les électrons libres sont représentés par un point. **A**, radical semiquinonimique, d'après Sealy *et al.*, 1982. **B**, radical semiquinone, d'après Godechal & Gallez, 2011.

L'électron a un mouvement de rotation sur lui-même caractérisé par le nombre quantique de spin  $S$ . Sous l'effet d'un champ magnétique extérieur  $B$ , il y a séparation des niveaux d'énergie du spin en  $(2S+1)$  états qui sont chacun affecté d'un nombre quantique magnétique  $M_S$  : c'est l'effet Zeeman. Plus  $B$  est intense, plus cette séparation des niveaux est grande (**Fig. 51a**). Dans le cas d'une espèce chimique paramagnétique ne présentant qu'un seul électron célibataire (donc pour lequel  $S = 1/2$ ), la présence du champ magnétique extérieur donne lieu à  $(2S + 1) = 2$  états, correspondant à  $M_S = -1/2$  et  $M_S = +1/2$ . L'énergie magnétique associée à chacun de ces états est

$$E(M_S) = M_S g \beta B$$

où

- $M_S$  est la valeur du nombre quantique magnétique de spin ( $+1/2$  ou  $-1/2$  pour l'électron libre)
- $g$  est le facteur de Landé, sans dimension et caractéristique du centre paramagnétique
- $\beta$  est le magnéton de Bohr ( $\beta = 9,2741 \times 10^{-24} \text{ JT}^{-1}$ ).
- $B$  est valeur du champ magnétique

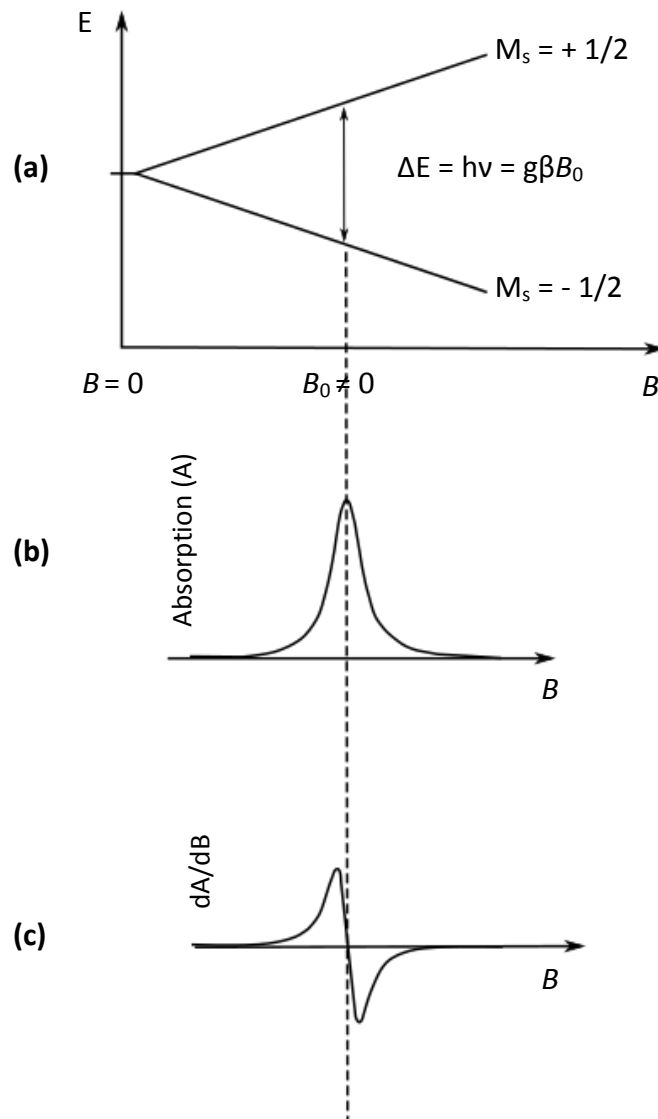
Outre le champ magnétique  $B$ , le spectromètre RPE comporte un dispositif engendrant une onde électromagnétique de fréquence  $\nu$ . Lorsque le champ magnétique  $B$  prend une amplitude telle que l'écart entre les deux niveaux Zeeman coïncide avec le quantum d'énergie  $h\nu$  de l'onde électromagnétique, cette dernière est absorbée par le système et il se crée un phénomène de résonance. Ces transitions entraînent une absorption d'énergie qui génère dans le spectromètre un signal d'absorption qui constitue la raie de résonance (**Fig. 51b**). Le signal d'absorption est du type gaussien autour d'une valeur  $B_0$ . Pour plus de commodité, c'est en réalité la dérivée du signal d'absorption par rapport à  $B$  que l'on observe (**Fig. 51c**). On obtient donc l'équation fondamentale de la RPE :

$$h\nu = g\beta B_0$$

où

- $h$  est la constante de Planck ( $6,62 \times 10^{-24} \text{ Js}$ )
- $\nu$  est la fréquence du champ micro-onde.

Connaissant les valeurs de la fréquence  $\nu$ , qui dans la pratique est mesurée à l'aide d'un fréquencemètre, et du champ de résonance  $B_0$  nous pouvons en déduire celle du facteur de Landé  $g$ .



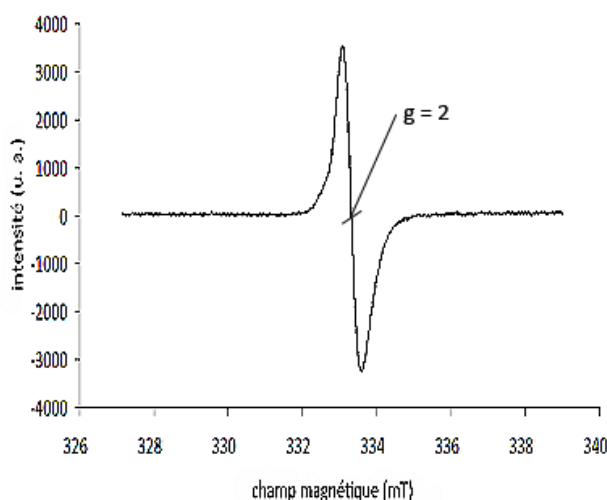
**Figure 51. Principe et résultat type en RPE. (a)**, niveaux d'énergie d'un centre paramagnétique  $E(M_s)$  en fonction du champ magnétique  $B$ . **(b)**, signal en absorption en présence d'une radiation électromagnétique de fréquence  $\nu$ . **(c)**, forme de la dérivée du signal d'absorption. D'après Bertrand, 2010.

Lorsque l'électron célibataire se trouve à proximité d'un noyau de spin nucléaire  $I$  non nul (exemple  $N^{14}$  :  $I=1$ ), il apparaît un phénomène de couplage magnétique qui démultiplie la raie RPE. On observe  $2I+1$  raies séparées par une constante de couplage  $A$ .

### Première analyse : analyse de la mélanine de *Sepia* pure

Afin de déterminer les conditions de résonance de la mélanine et de déterminer les paramètres d'acquisition adaptés du spectromètre, nous avons effectué l'analyse en RPE de mélanine pure de l'encre de *Sepia officinalis* (Melanin from *Sepia officinalis*, Sigma-Aldrich).

Le spectre de la mélanine de *Sepia officinalis* a montré un signal clair (**Fig. 52**) comportant une raie unique (valeur de  $g$  autour de 2). Ce signal correspond au signal d'eumélanine semiquinone identifié dans des études antérieures (Blois *et al.*, 1964 ; Matsuura *et al.*, 2009).

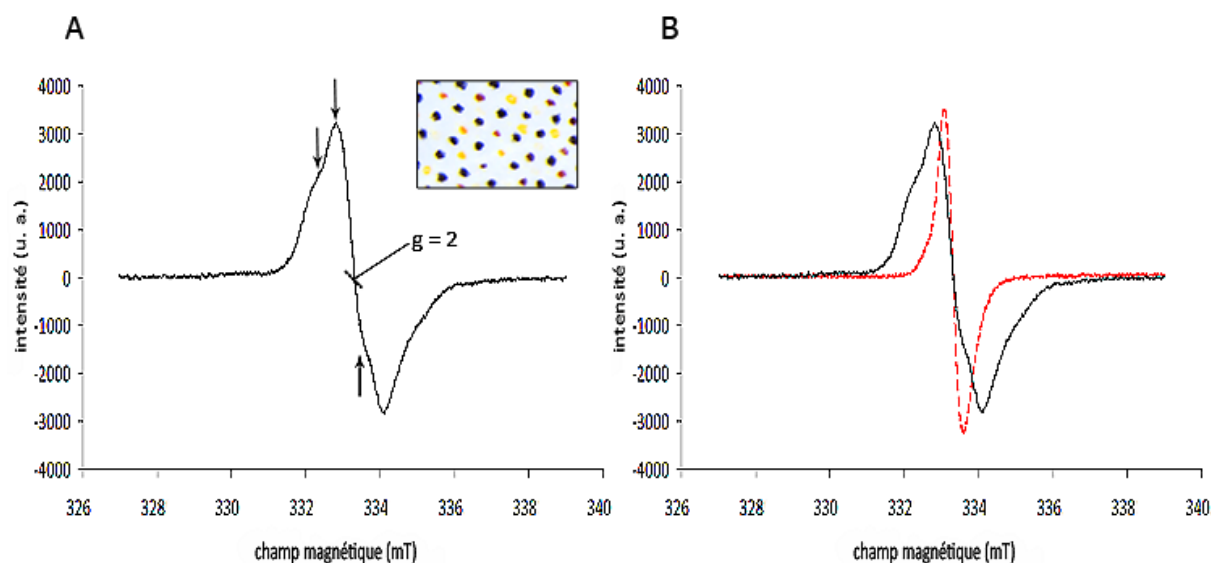


**Figure 52.** Spectre RPE de l'eumélanine pure en bande X ( $\nu = 9,37$  GHz) et à 104K (azote liquide)

La première analyse nous a permis de déterminer les paramètres adéquats du spectromètre RPE, en bande X (9,37 GHz) avec une amplitude de modulation de 0,2 mT, une puissance micro-onde de 1mW et un balayage du champ magnétique de 327 à 339 mT. Un des avantages de cette technique, est qu'elle est aveugle à toute molécule non paramagnétique. Il n'est donc pas nécessaire d'extraire les pigments des tissus.

### Deuxième analyse : analyse de la peau de la face dorsale du manteau

Le test effectué sur une peau unique d'un embryon présentant les trois classes de couleurs n'a pas permis d'obtenir de signal. Afin d'obtenir un signal suffisant, celui-ci étant proportionnel au nombre de radicaux présents, dix peaux présentant les trois classes de couleurs ont été placées dans le spectromètre (**Fig. 53**). De plus, les analyses ont été effectuées à basse température (104K, en azote liquide) afin d'augmenter l'intensité du signal, le signal étant inversement proportionnel à la température selon la loi de Curie. Il a été démontré que la mélanine suit cette loi (Blois *et al.*, 1964).

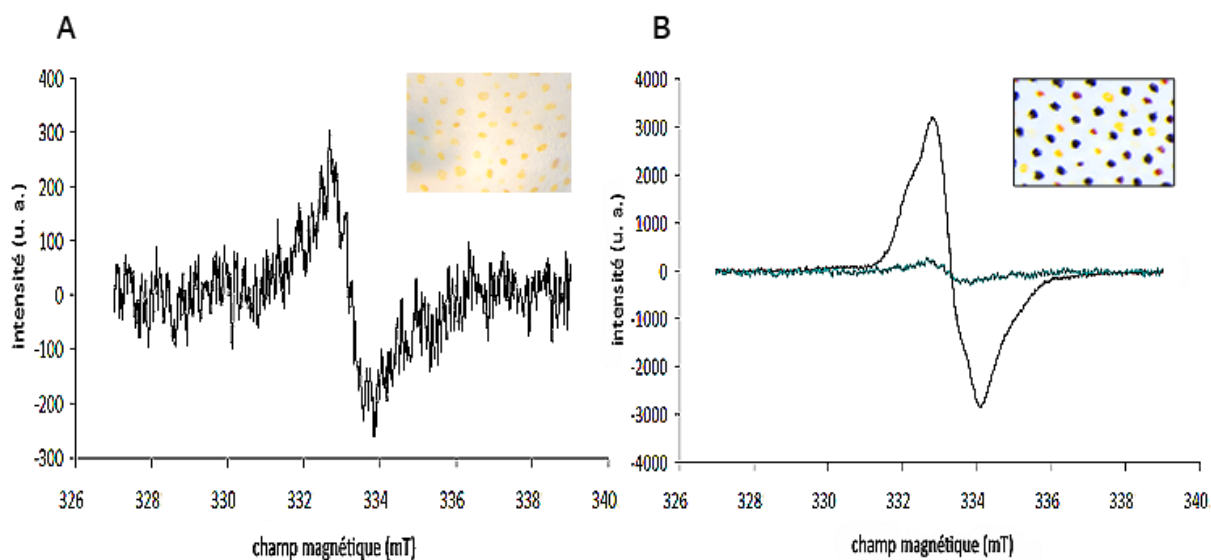


**Figure 53. A**, spectre RPE de la peau de la face dorsale du manteau en bande X ( $\nu = 9,37839$  GHz) et à 104K ; le sommet des raies est indiqué par les flèches. **B**, spectre RPE de l'eumélanine (**en rouge**) superposé au spectre RPE de la peau de la face dorsale (**en noir**).

Le spectre RPE de la peau de la face dorsale du manteau semble plus complexe que celui obtenu avec la mélanine pure, avec la présence de trois raies (dont les sommets sont indiqués par les flèches) et un spectre plus large qui laisse supposer la présence d'autres molécules et potentiellement d'autres formes de mélanine telles que la pheomélanine (Slominski *et al.*, 2004). Celle-ci est caractérisée par un spectre RPE à trois raies dues à la présence d'un noyau d'azote ( $I_N=1$  ; **Fig. 53A**) à proximité de l'électron célibataire dans la pheomélanine. D'autres analyses sont nécessaires afin d'affiner les mesures et de tenter la séparation des espèces chimiques par différence spectrale.

### Troisième analyse : analyse de la peau de la face ventrale du manteau

Une nouvelle analyse (dans les mêmes conditions) a été effectuée cette fois-ci sur la peau de la face ventrale du manteau. Nous avons choisi de travailler avec une peau qui présente qu'un seul type de pigmentation afin de voir s'il était possible de discriminer différentes molécules en fonction de la teinte des chromatophores. Nous avons donc utilisé la peau provenant d'un embryon présentant majoritairement des chromatophores jaunes. Afin d'obtenir un signal comparable avec celui obtenu sur la face dorsale du manteau, dix peaux ont été placées dans le spectromètre.



**Figure 54.** **A**, spectre RPE ( $\nu = 9,37839$  GHz) en solution et à basse température ( $T$   $N_2$  liquide) de la peau de la face ventrale du manteau ; **B**, spectre RPE de la peau de la face dorsale (**en noir**) superposé au spectre RPE de la peau de la face ventrale (**en vert**).

Malgré la présence de plusieurs peaux dans le spectromètre, l'intensité du spectre est beaucoup moins élevée (dix fois moins) que pour la peau de la face dorsale, ce qui explique la qualité du spectre, le rapport signal sur bruit étant plus faible que pour celui obtenu sur la face dorsale du manteau (**Fig. 54A**). Cette différence d'intensité (à nombre de peaux égal) peut s'expliquer par la plus faible densité en chromatophore de la face ventrale par rapport à la face dorsale, mais peut être également due à une quantité moindre de phéomélanines dans les chromatophores jaunes. De nouvelles analyses seront nécessaires pour obtenir un spectre mieux défini et plus informatif.

### Interprétation et perspectives

Les premières analyses en RPE semblent suggérer **la présence de phéomélanine, dans la peau de *Sepia officinalis***. Des analyses supplémentaires sont nécessaires pour pouvoir confirmer ces premiers résultats, notamment en reliant l'intensité du signal à une surface de peau et à une quantité de chromatophores. Les ommochromes présentent aussi des radicaux qui peuvent résonner en RPE. Mais au cours de ces premières analyses nous n'avons pas visualisé de spectres pouvant se rapprocher des spectres RPE des ommochromes (Vazquez *et al.*, 2000). Deux hypothèses peuvent être émises. La première est qu'il n'y aurait pas d'ommochrome dans la peau de *Sepia officinalis*, mais plusieurs études ont supposé cette présence (Linzen, 1976 ; Van den Branden & Declair, 1976). La seconde serait que les ommochromes sont sous forme diamagnétique dans la peau (c'est-à-dire non radicalaire) et ne sont donc pas visibles en RPE. Les radicaux des ommochromes sont peut-être plus instables que ceux de la mélanine. De nouvelles analyses RPE pourront donc être menées sur la peau de *Sepia officinalis* de manière à infirmer ou confirmer la présence d'ommochromes et d'en déterminer la diversité.

Une méthode dérivée de la spectroscopie en RPE, appelée imagerie en RPE, consiste à ajouter un champ externe à gradient qui module le champ résonant des espèces chimiques paramagnétiques en fonction de leur position dans l'espace (Godechal & Gallez, 2011). En conséquence, il est possible d'obtenir des cartes 2D et 3D de la distribution des radicaux libres. Cette technique, à terme, pourrait permettre de cartographier la peau de *Sepia officinalis* et ainsi d'attribuer un signal et donc une molécule à une couleur mais aussi permettrait peut être de déterminer s'il y a des couleurs transitoires dues à la maturation ou la synthèse de pigments et ainsi de définir de manière plus définitive les différentes classes de couleurs des chromatophores chez les Coléoides.



## 1.4 La recherche de marqueurs moléculaires de différenciations des chromatophores en développement

La compréhension des voies moléculaires à l'origine du pattern de distribution des chromatophores nécessite le développement d'outils de marquage des chromatophores, et si possible des chromatophores non encore différenciés de manière à comprendre les premières étapes de la différenciation de ces structures neuromusculaires et de déterminer à quel moment ils deviennent fonctionnels. Les marqueurs généralement développés sont souvent de type histologique ou immunochimique (détection d'enzymes ou de protéines spécifiques). Néanmoins ce sont les marqueurs « génétiques » (facteurs de transcription, gènes de développement plus ou moins précoces) qui sont les plus informatifs car ils permettent ensuite d'étudier les cascades génétiques qui dirigent le développement des structures. Nous avons décidé de nous focaliser sur trois marqueurs du fonctionnement des chromatophores :

- a) la détection de la « nitric oxyde synthase » (NOS) présente dans les fibres musculaires des chromatophores ;
- b) la détection des FaRPs dans les fibres nerveuses qui innervent les fibres musculaires des chromatophores ;
- c) la détection de la tyrosinase, enzyme impliquée dans la synthèse des mélanines.

### a) recherche de l'expression de la NOS dans les chromatophores

L'oxyde nitrique (NO pour Nitric Oxide) est impliquée dans de nombreuses fonctions chez les métazoaires (Palumbo, 2005 ; Palumbo & d'Ischia, 2007). Le NO est produit par l'oxydation de l'arginine-L grâce à l'action de la NO synthase (NOS). Chez la seiche, le NO intervient dans l'activité de la glande à encre et le système de défense (Palumbo *et al.*, 2000; Fiore *et al.*, 2004). En tant que neurotransmetteur et relais intramusculaire, il régule également la pression sanguine, l'activité des statocystes et contrôle l'activité des chromatophores (Mattiello *et al.*, 2010). Dans la peau de l'embryon et de l'adulte, la présence du NO et de la NOS ont pu être mis en évidence dans le sac pigmentaire ainsi que dans les fibres musculaires des chromatophores (Mattiello *et al.*, 2010).

Les méthodes utilisées pour mettre en évidence la présence de NO et de NOS sont particulièrement bien maîtrisées par l'équipe d'Anna Palumbo à la station zoologique de Naples. Trois méthodes sont principalement employées :

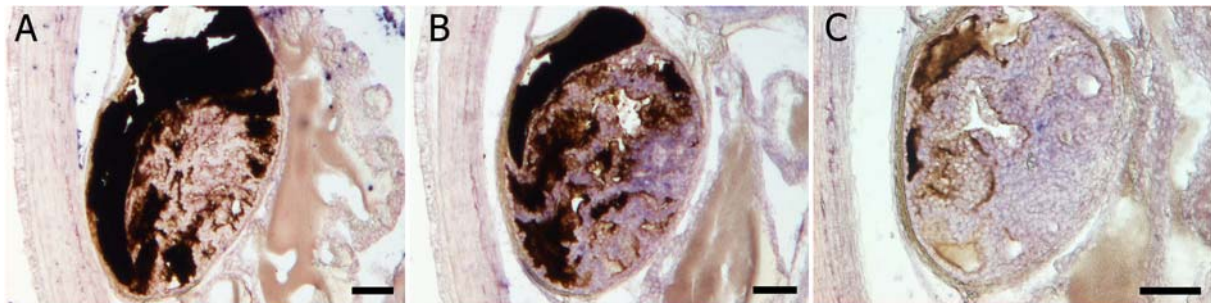
- l'utilisation de la NADPH diaphorase qui permet de détecter indirectement la présence de la NOS en mettant en évidence son activité;
- l'utilisation d'un anticorps contre la NOS (immunomarquage) ;
- l'utilisation du DAF-FM-DA, un « piègeur » fluorescent du NO qui met en évidence la présence de NO.

Nous avons voulu développer, en collaboration avec l'équipe d'Anna Palumbo, des hybridations *in situ* envers les ARNm de la NOS, afin de suivre, au cours du développement embryonnaire, l'expression et la localisation de ces gènes, d'en déduire le rôle de chacune des deux formes (NOSa et NOSb ;

Scheinker *et al.*, 2005) et donc de déterminer le moment où la voie NOS est fonctionnelle chez les chromatophores.

### Résultats

Les deux formes de NOS chez *Sepia officinalis* sont très semblables, les seules différences se situent en une seule zone de sept acides aminés avec chez NOSa (numéro accession AY582749) une lacune de six acides aminés sur sept par rapport à NOSb (numéro accession AY582750). Afin d'obtenir les deux formes, des amorces spécifiques ont été dessinées de part et d'autre de cette zone. Des amplifications par PCR ont été réalisées sur l'ADNc obtenu à partir d'un pool d'ARN d'embryon de *S. officinalis* aux différents stades de développement avec les amorces NOS-F1 (5'-TTCCGGAGTTTTTGGCAACAA-3' ; FRSFWQQ) et NOS-R2 (5'-CCAAAGATATCTTCATGGAA-3' ; PKISSW). Après clonage et séquençage des produits de PCR, nous avons obtenu deux séquences de 460 nucléotides pour chacune des formes de NOS existantes (séquences cf. **annexe A6**). Afin de déterminer si NOS est exprimé dans les chromatophores au cours du développement de *S. officinalis*, j'ai utilisé des sondes ARN anti-sens synthétisées à partir de l'ADNc des séquences NOSa et NOSb. Plusieurs hybridations *in situ in toto* ont été réalisées sur des stades différents (allant du stade 24 au stade 29) mais aucun signal n'a été observé. NOS étant connu pour s'exprimer dans la glande à encre, j'ai réalisé une ISH sur des coupes d'embryon au stade 29, en prenant soin de sélectionner celles qui passaient par la glande à encre (**Fig. 55**).



**Figure 55.** Hybridation *in situ* NOS sur coupe, au niveau de la glande à encre, d'un embryon au stade 29. **A**, avec la sonde sens NOSb (témoin négatif). **B**, avec la sonde anti-sens NOSa. **C**, avec la sonde anti-sens NOSb. Barres d'échelle : **A**, **B**, **C** = 100µm.

### Interprétation et discussion

Les deux sondes permettent de visualiser un marquage dans la glande à encre, ce qui confirme le bon fonctionnement de celles-ci. L'absence de marquage en hybridation *in situ in toto* au niveau des chromatophores est peut être due à une expression de ces gènes en trop faible quantité pour être détectée par cette technique, ou alors, les ARNm transcrits sont traduits très rapidement en protéine et ne sont plus accessibles.

Récemment, une étude a découvert la présence de NOS et la production NO au sein des iridophores de la peau de *S. officinalis* (Mattiello *et al.*, 2013). Ce médiateur physiologique interviendrait à la fois sur les chromatophores et sur les iridophores, et ne serait donc pas un bon marqueur des chromatophores.

Ce travail de mise au point, même s'il n'a pas abouti à ce que nous espérions, m'a néanmoins permis d'étudier l'activité de la NOS au sein du derme en développement de l'embryon chez *S. officinalis* (article n°2).

## **b) Recherche de l'expression des FaRPs dans l'embryon de *S. officinalis***

Les FaRPs (FMRF-amide-Related Proteins) constituent une famille de neuropeptides présente chez la plupart des métazoaires et impliquée dans le contrôle d'une large gamme de fonctions : reproduction, locomotion, alimentation (Li *et al.* 1999). Chez les mollusques, leur présence dans le système nerveux central et périphérique est également associée au fonctionnement des organes sensoriels, à l'osmorégulation (Lopez-Vera *et al.* 2008) ou encore au contrôle des patterns colorés chez les céphalopodes (Tublitz *et al.* 2006). Afin de décrire pour la première fois la différenciation de neurones à FaRPs chez un céphalopode, le gène FaRP de la seiche a été recherché, cloné et des hybridations *in situ* ont été réalisées. De même, des immunomarquages ont été effectués à l'aide d'un anticorps développé contre les FaRPs (Labomics SA, Belgique) spécifique des FaRPs de *S. officinalis*.

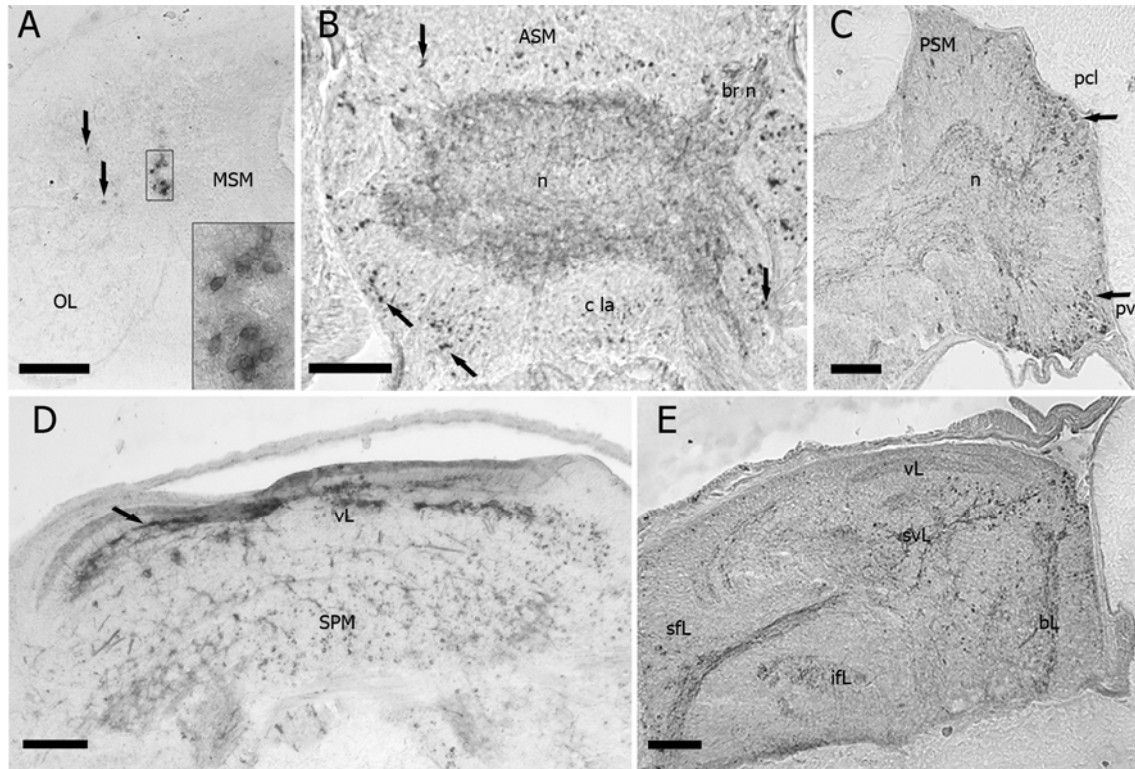
### Résultats

Des amplifications par PCR ont été réalisées sur l'ADNc obtenu à partir d'un pool d'ARN extrait d'embryons de *Sepia officinalis* aux différents stades de l'organogénèse à l'aide des amorces FaRP-F (5'-GCCCTGTCAGGAGATGCTTTC-3', ALSGDAF) et FaRP-R (5'-GAACCTCTTGTCGGCTTCTG-3', PEADKRF) dessinées à partir de la séquence de *Sepia officinalis* (Numéro accession Y11246 ; Loi & Tublitz, 1997). Des fragments de 668 nucléotides ont été obtenus correspondant aux nucléotides 552 à 1220 de la séquence d'ADNc de *S. officinalis*, incluant une séquence ALSDGLFLRF, une séquence FLRF et neuf séquences FMRF (cf. **annexe A7**). Ces séquences ont été identifiées comme des séquences de FaRP après alignement avec la séquence de FaRP publiée. En vue d'hybridations *in situ*, une sonde anti-sens et une sonde sens ont été synthétisées après l'insertion de la séquence FaRP dans un plasmide.

Des réactions d'immunomarquages ont aussi été réalisées à l'aide d'un anticorps polyclonal commercial dirigé contre un FMRFamide tetrapeptide, après vérification de la spécificité de celui-ci (cf. méthodologie).

Dans le système nerveux central en développement, des cellules à FaRPs apparaissent dans les lobes optiques et les tractus optiques (OL, OT, au stade 23), dans la masse sous-œsophagienne

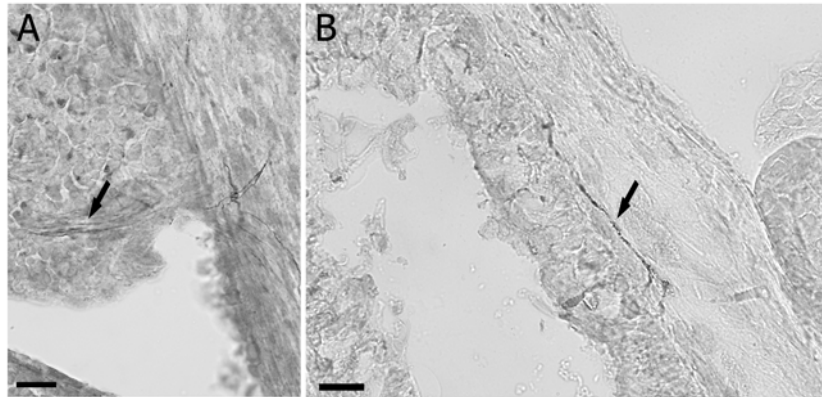
antérieure et postérieure (ASM, MSM, au stade 23), dans la masse supra-œsophagienne (SPM, au stade 26) principalement dans les lobes verticaux (vL) et les lobes basaux (bL) (Fig. 56).



**Figure 56.** **A**, coupe transversale du lobe optique et le MSM d'un embryon au stade 23 après hybridation *in situ*. Des corps cellulaires colorés ont été observés dans la moelle du lobe optique (flèches noires) et au niveau de la jonction du lobe optique et du MSM (encadré noir). **B**, coupe transversale à travers la ASM d'un embryon au stade 29 montrant une immunoréactivité au FaRP (FaRP-IR). Des corps cellulaires colorés ont été localisés dans la couche cellulaire (c la) de la ASM (flèches noires) et des fibres colorées ont été observés dans le neuropile (n) et les nerfs brachial (br n). **C**, coupe longitudinale (antérieur gauche) à travers la PSM d'un embryon au stade 29. Une FaRP-IR a été détectée dans des fibres situées dans le neuropile (n) et dans des corps cellulaires situés dans le lobe des chromatophores postérieurs (pcl, flèche noire) et dans le lobe palliovisceral (pvl, flèche noire). **D**, coupe transversale du SPM d'un embryon au stade 29 montrant des corps cellulaires et des fibres (flèche noire) FaRP-IR dans le lobe vertical (vL). **E**, Coupe longitudinale (antérieur gauche) à travers le SPM d'un embryon au stade 29. Les corps cellulaires FaRP-IR étaient pour la plupart situés sur la partie postérieure de la SPM (vL, lobes verticales et bL, lobes basales) et des fibres colorées ont été observées dans chaque lobe de la SPM. Abréviations : ASM, masse sous-œsophagienne antérieure ; bL, lobe basal ; ifL, lobe frontal inférieur ; MSM, masse sous-œsophagienne postérieure ; PSM, masse supra-œsophagienne postérieure ; sfL, lobe frontal supérieur ; SPM, masse supra-œsophagienne. Barres d'échelle : **A, B, C, D** = 100µm ; **E** = 50µm.

Dans le système nerveux périphérique en développement, des cellules à FaRPs apparaissent au niveau de l'épiderme du manteau, des bras et sur les branchies (au stade 26). De nombreuses fibres présentent une immunoréactivité aux FaRPs dès le stade 23 : dans les muscles des bras, des

ventouses, dans les muscles du manteau et dans le derme. En absence de corps cellulaires marqués dans ces mêmes structures, nous avons fait l'hypothèse qu'il s'agit de fibres motrices (**Fig. 57**).



**Figure 57.** **A**, coupe transversale du ganglion stellaire, fibres FaRP-IR (flèche noire) détectées dans les ganglions stellaires d'un embryon au stade 26. **B**, fibres FaRP-IR (flèche noire) au niveau du derme dans une coupe transversale au niveau de la peau d'un embryon au stade 29. Barres d'échelle : **A**, **B** = 20 $\mu$ m.

#### Interprétation et discussion

L'ensemble des territoires marqués à partir du stade 23 présente un parallèle très fort avec les territoires connus pour être impliqués dans la chaîne du contrôle nerveux des chromatophores : lobes optiques > tractus optiques > lobes basaux et verticaux > centres moteurs inférieurs (ASM, MSM, PSM dont les lobes des chromatophores) > fibres au sein des fibres du manteau puis dans le derme (Boycott 1961 ; Dubas *et al.* 1986). Ce constat nous a permis de confirmer l'existence d'une « voie FaRP » de contrôle des chromatophores chez *S. officinalis* (Loi and Tublitz 1997, 2000, Tublitz *et al.* 2006) et nos résultats nous ont permis de démontrer que cette voie se met en place autour du stade 26. Ces résultats et ces conclusions ont fait l'objet d'une publication (**article n°1**). Au niveau de la peau, les fibres motrices semblent arriver au niveau des chromatophores (**Fig. 57**) mais il reste assez difficile d'observer les chromatophores et les zones de jonctions neuromusculaires, par les techniques d'hybridation *in situ* comme par immunomarquage.

#### **c) Recherche de l'expression de la tyrosinase dans les chromatophores**

D'après les premiers résultats obtenus par la technique de RPE, il semblerait que les chromatophores puissent renfermer des pheomélanines. Ces pheomélanines sont formées grâce à la catalyse de la tyrosine et de la cystéine par la tyrosinase. La découverte de cette enzyme clé de la synthèse de cette molécule au sein des chromatophores en développement constituerait un indice supplémentaire de la présence de pheomélanine au sein des cellules pigmentaires et nous permettrait d'établir le suivi de la mise en place de ces cellules avant l'apparition des pigments.

## Résultats

Le gène de la tyrosinase a été recherché à l'aide des amorces Tyr-F (5'-ATGACCCCTGAGGAGTATATCCA -3', MTPEEYIQ) et Tyr-R (5'-CTGAAACGGTGCCACCAATCCA -3', WIGGTVSV) dessinées à partir de la séquence de *Sepia officinalis* (Numéro accession AJ297474.1 ; Lieb *et al.*, 2000). Des amplifications par PCR ont été réalisées sur l'ADNc obtenu à partir d'un pool d'ARN extrait d'embryons de *Sepia officinalis* aux différents stades de l'organogénèse et des fragments de 621 nucléotides ont été obtenus correspondant aux nucléotides 198 à 832 de la séquence d'ADNc de *S. officinalis* (cf. **annexe A8**). Ces séquences ont été identifiées comme des séquences de la tyrosinase après alignement avec la séquence de la tyrosinase publiée. Afin de pouvoir procéder à des hybridations *in situ*, une sonde anti-sens et une sonde sens ont été synthétisées après l'insertion de la séquence de la Tyrosinase dans un plasmide.

Plusieurs hybridations *in situ* ont été effectuées sur différents stades : au stade 24 (stade avant l'apparition des quatre premiers chromatophores pigmentés), au stade 25 (stade présentant les quatre premiers chromatophores pigmentés) et au stade 29 (stade de diversification des couleurs pigmentaires). Les premiers essais d'hybridation n'ont malheureusement pas permis d'obtenir des résultats interprétables et de nouvelles expériences devront être réalisées.

## Interprétation et discussion

L'absence de signal peut être expliquée par un problème de qualité de sonde. Avant la poursuite de ce travail, une vérification sera faite par hybridation *in situ* sur des cryo-coupes passant par la glande à encre, où la production de tyrosinase est connue (Prota *et al.*, 1981 ; Naraoka *et al.*, 2003).

Une autre explication serait que la voie de synthèse de la pheomélanine des chromatophores chez *S. officinalis* ne se fait pas via la tyrosinase mais plutôt via la phénoloxidase. Cette activité enzymatique a été mise en évidence dans l'hémocyanine de divers céphalopodes, *Octopus vulgaris*, et *Sepia officinalis* (Siddiqui *et al.*, 2006 ; Campello *et al.*, 2008). Une phénoloxidase a été caractérisée dans la poche à encre chez *Octopus ocellatus* (Fan *et al.*, 2009) et une activation de la phénoloxidase a été mise en évidence chez les embryons de *S. officinalis* en réponse à une exposition à des contaminants métalliques (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2009). Cette enzyme semble en effet impliquée chez de nombreuses espèces comme facteur humoral de défense de l'hôte via mélanisation comme chez les insectes et les crustacés (Fan *et al.*, 2009). Une étude de l'expression de la phénoloxidase pourrait donc être également menée chez *S. officinalis* pour étudier cette hypothèse.

L'étude des chromatophores en développement chez *S. officinalis* reste, pour le moment, dans un état que l'on pourrait qualifier *d'embryonnaire*. Les pistes ouvertes par ce travail, et qui pour la plupart n'ont pas encore abouti à des résultats tangibles, méritent d'être encore explorées. Dans ce domaine, tous les résultats clairement démontrés (positifs comme négatifs) sont importants et méritent d'être publiés. Je m'y attacherai au-delà de ce travail de thèse.

---

## Partie 2

# Etude des iridophores chez *S. officinalis* : aspects développementaux, génétiques et évolutifs

---

Chez les céphalopodes, l'iridescence est un phénomène physique localisé au sein de cellules spécifiques – les iridophores – et produite par des interférences entre les ondes lumineuses réfléchies par des nanostructures faites de protéines, les réflectines. Afin de comprendre l'évolution et le développement de ces structures iridescentes chez les céphalopodes, nous avons engagé un travail d'analyse génétique et moléculaire des iridophores et des réflectines en particulier. La nature protéique des nanostructures produisant de l'iridescence chez les céphalopodes est un caractère unique qui offre l'opportunité de pouvoir suivre, par hybridation *in situ*, la mise en place de structures iridescentes au cours du développement d'un métazoaire.

Je présenterai dans cette partie, ma démarche, les résultats que j'ai obtenus, ainsi que les conclusions directes que nous avons pu en tirer. Certains de ces travaux ont fait l'objet d'une publication (**article n°4**), d'autres, encore en cours, seront poursuivis au delà de cette thèse et feront l'objet ici de paragraphes « perspectives ». Le développement des iridophores était, au début de mon travail de thèse, totalement inconnu. L'exploration dans ce domaine a été conduite suivant trois axes méthodologiques :

▶ du point de vue descriptif :

**2.1** : déterminer l'apparition de l'iridescence au cours du développement et préciser la localisation des iridophores dans la peau et les organes en développement

**2.2** : connaître la diversité des gènes de réflectines chez *S. officinalis*

▶ du point de vue développemental :

**2.3** : décrire la dynamique de développement des iridophores au cours de l'embryogenèse

**2.4** : évaluer une éventuelle spécificité tissulaire des gènes de réflectines

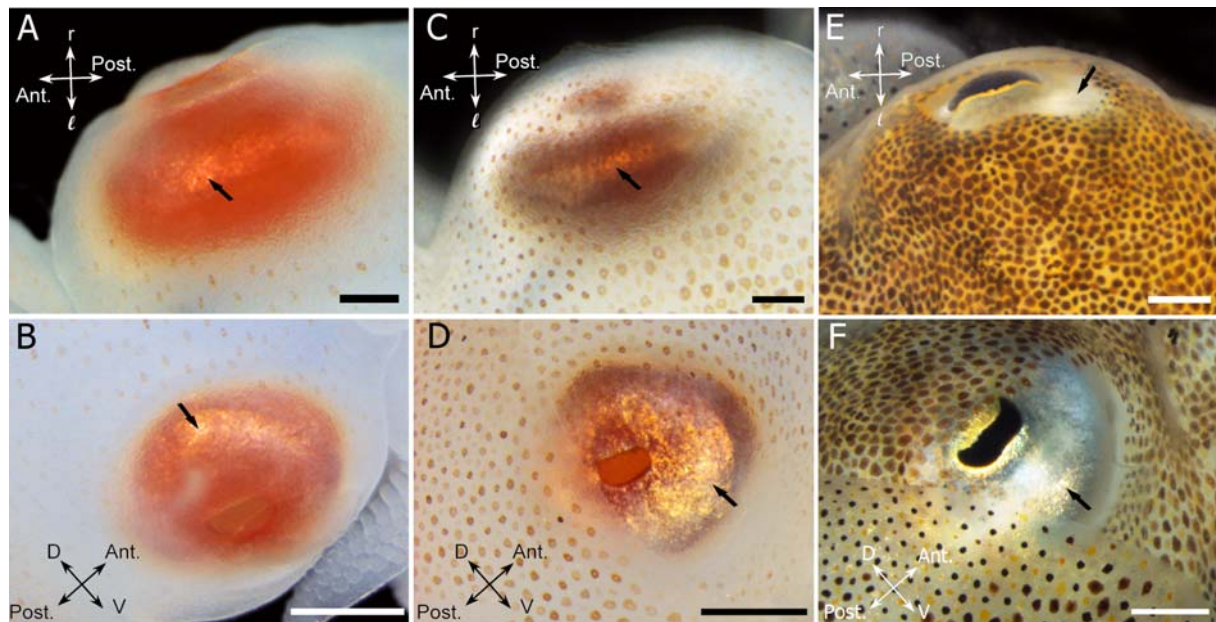
▶ du point de vue évolutif :

**2.5** : comprendre la diversité des formes de réflectines au sein des céphalopodes

## 2.1 L'apparition de l'iridescence dans l'embryon de *S. officinalis*

L'iridescence est visible chez la seiche adulte et chez le juvénile mais avec quelques différences. Au cours de la croissance, l'iridescence augmente au niveau de la face ventrale du manteau, elle est peu présente chez le juvénile alors que cette iridescence est très importante chez l'adulte (Hanlon et Messenger, 1988). Nous nous sommes donc demandés comment et où les iridophores étaient mis en place au cours du développement chez l'embryon. Il nous a semblé pertinent d'avoir une première approche descriptive sur l'embryon pour savoir si des iridophores sont effectivement mis en place pendant l'embryogenèse ou non, et si tel est le cas, avec quelle dynamique spatio-temporelle. Cette description n'avait en effet jamais été réalisée chez l'embryon d'aucun céphalopode. J'ai donc concrètement sorti de leur capsule des embryons vivants à différents stades et cherché des effets d'iridescence à la loupe binoculaire en condition d'éclairage classique. J'ai également réalisé des coupes semi-fines pour identifier la localisation précise des iridophores au sein des structures iridescentes en développement. Les principaux résultats de ce travail ont été publiés dans l'article n°4 et en voici les points les plus importants :

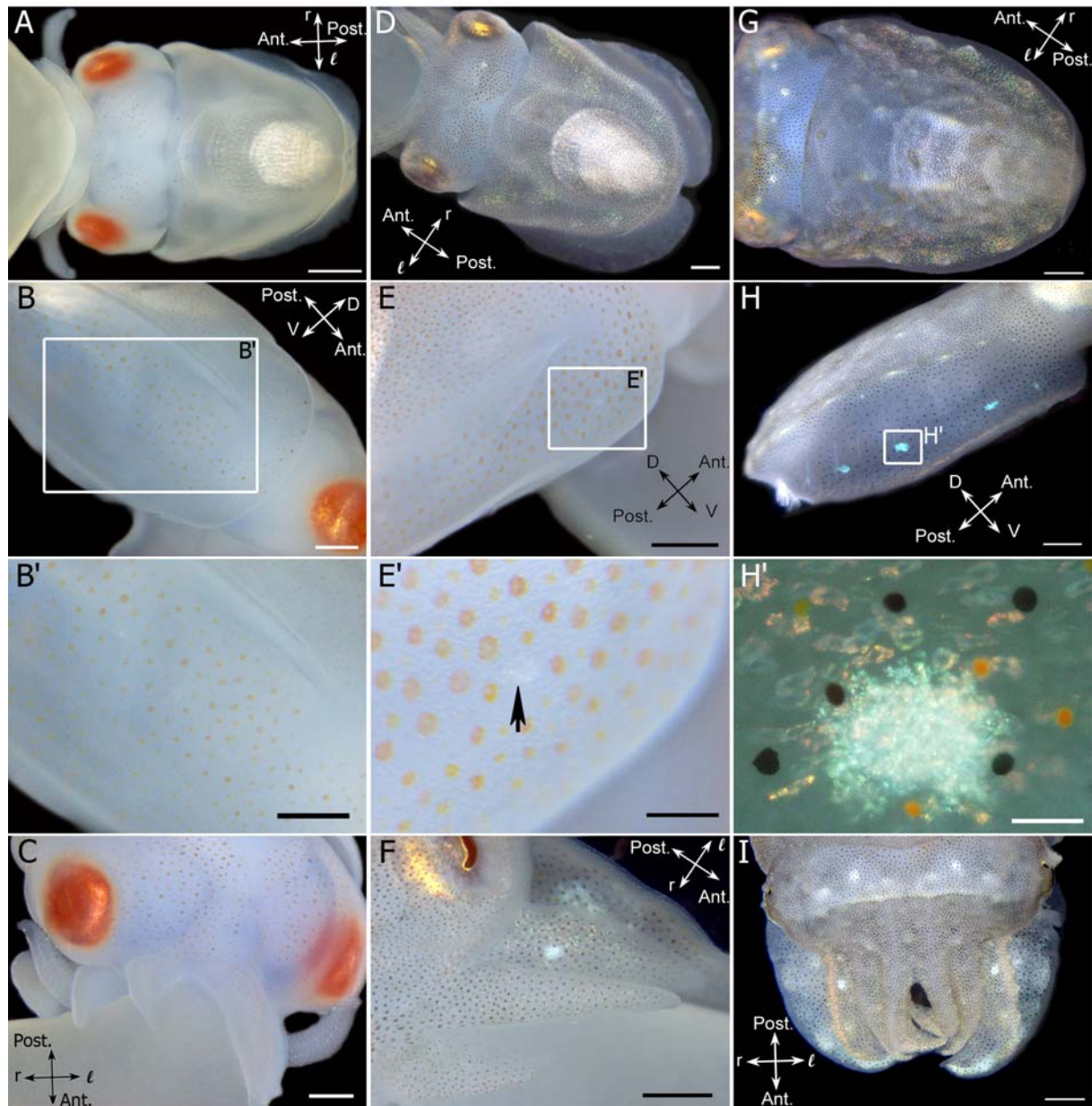
Dans les yeux : La première évidence d'iridescence apparaît dans les yeux au niveau de l'iris au stade 27. Cette iridescence s'étend ensuite sur toute la surface de l'iris au stade 29 pour finir par recouvrir en totalité l'iris et donner, à l'éclosion, l'effet miroir que l'on observe chez le juvénile (**Fig. 58**).



**Figure 58. Phénomènes d'iridescence observés sur les yeux d'embryons vivants** du stade 27 à l'éclosion, observés sous loupe binoculaire après retrait de la capsule. **A-B**, stade 27 ; **C-D**, stade 29 ; **E-F**, éclosion. Barres d'échelle : **A** = 200 $\mu$ m ; **C** = 400 $\mu$ m ; **B, D, E, F** = 500 $\mu$ m.



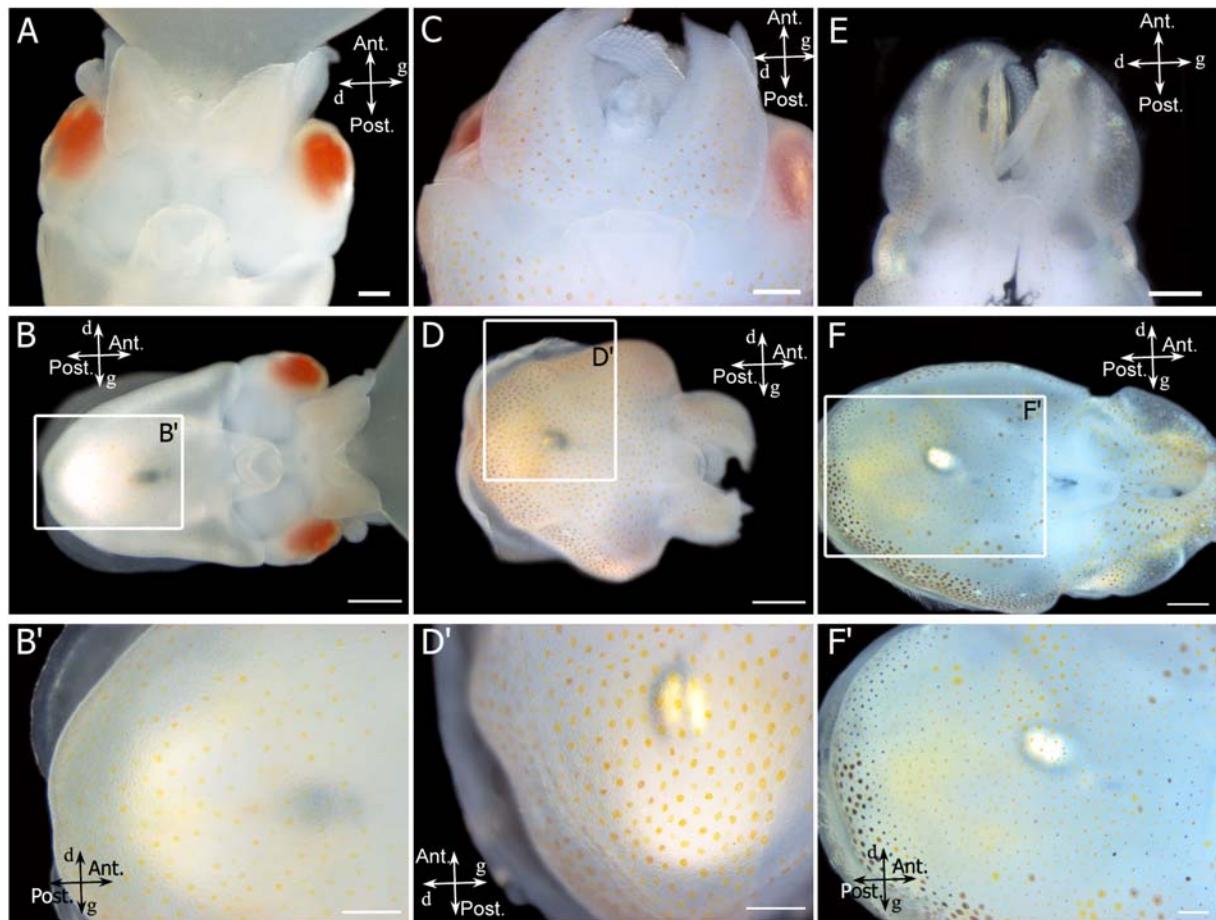
A partir du stade 27, l'iridescence commence à apparaître sur les autres parties du corps, dans la peau du manteau, des bras et de la tête (Fig. 59).



**Figure 59. Phénomènes d'iridescence observés sur la face dorsale d'embryons vivants du stade 27 à l'éclosion, observés sous loupe binoculaire après retrait de la capsule. A-C, stade 27 ; D-F, stade 29 ; G-I, éclosion. Barres d'échelle : A, D, G, H, I = 1mm ; B, B', C, E, F = 500µm ; E' = 200µm ; H' = 100µm.**

Dans la peau du manteau : sur la face dorsale du manteau, l'iridescence apparaît sous la forme de points épars, au stade 29 (Fig. 59D). Au stade 30, les iridophores s'organisent également en amas sur certaines zones du manteau. Sur les faces latérales du manteau, des iridophores s'organisent en

amas de cellules à partir du stade 29 (Fig. 59E, H, E', H'). Autour de ces amas, un grand nombre de cellules isolées est également décelable. Enfin, sur la face ventrale du manteau, aucune iridescence n'est observable quel que soit le stade (Fig. 60).

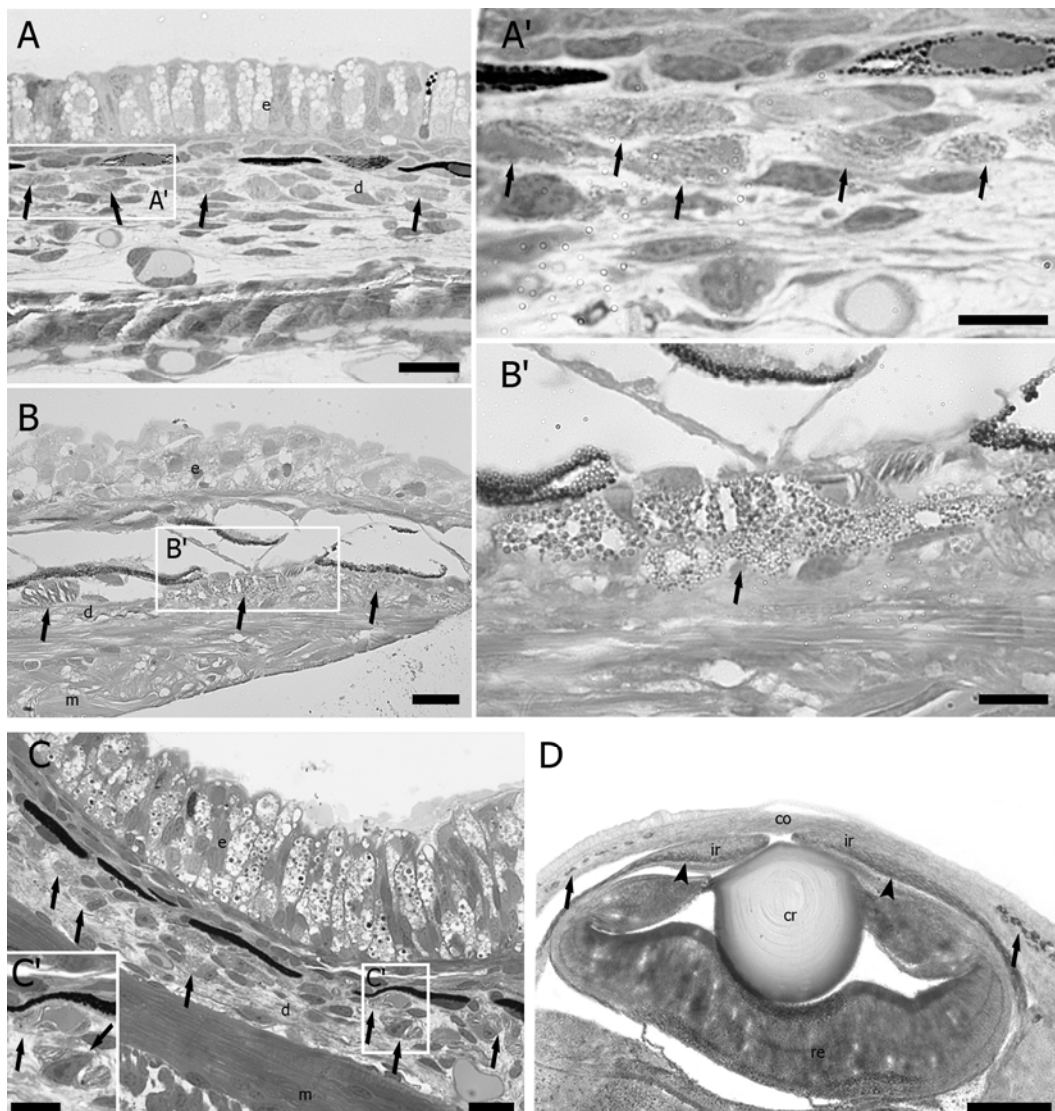


**Figure 60. Observations de la face ventrale d'embryons vivants** du stade 27 à l'éclosion, observés sous loupe binoculaire après retrait de la capsule. **A-B**, stade 27 ; **C-D**, stade 29 ; **E-F**, éclosion. Barres d'échelle : **A, B', C, D', F'** = 400 $\mu$ m ; **B, D, E, F** = 1mm. L'iridescence observée au centre du manteau sur **D, D', F, F'** est due à la présence de la poche à encre.

Dans la peau des bras : au stade 29, les iridophores sont organisés essentiellement de façon isolée sur les bras 1 et 2, à la fois de façon isolée et sous forme d'amas sur les bras 3 et essentiellement en amas sur les bras 5 (Fig. 59F). Les bras 4, qui correspondent aux futurs tentacules, ne présentent aucune iridescence quel que soit le stade observé. Le nombre d'iridophores augmente au stade 30, définissant des lignes irisées, roses ou pourpres sur la face dorsale des bras 1, 2 et 3 (Fig. 59I). Contrairement aux bras 1, 2 et 3 qui présentent de l'iridescence sur toute leur surface sauf au niveau des ventouses, le bras 5, le seul bras ventral (en contact avec le sol) qui a une forme beaucoup plus

aplatie (possédant donc une face dorsale et une face ventrale), ne présente pas d'iridescence sur sa partie ventrale (Fig. 60E).

Localisation des iridophores au sein de la peau : au niveau de la peau (manteau, bras et tête), les iridophores se développent au niveau du derme sous les chromatophores (Fig. 61). Les iridosomes semblent se former à partir de nanosphères de réflectine (Fig. 61B') qui s'assemblent en plaquettes au sein du cytoplasme (Fig. 61A', C'). Ce processus d'auto-assemblage des protéines en nanosphères a été mis en évidence dans une étude sur les propriétés de réflectines de synthèse (Kramer *et al.*, 2007). Dans les yeux, différents tissus présentent des iridophores et participent à l'iridescence globale de l'organe: l'iris (flèches Fig. 61D) et la paupière secondaire (tête de flèches Fig. 61D).



**Figure 61. Coupes semi fines et cryo-coupe sur embryon de *Sepia officinalis*. A, C, coupes transversales d'une portion de la peau de la face dorsale du manteau. B, coupe transversale d'une portion de la peau d'un bras. A, A' stade 27 ; B, B', C, C', stade 30 ; D, cryo-coupe frontale de l'œil au stade 29 après ISH à l'aide d'une sonde anti-ARNm de réflectine. Les iridophores sont indiqués par les flèches. Barres d'échelle : A, B, C = 20 $\mu$ m ; A', B'**

= 10 $\mu$ m ; **C'** = 1 $\mu$ m ; **D** = 200 $\mu$ m. Abréviations : **co**, cornée ; **cr**, cristallin ; **d**, derme ; **ep**, épithélium ; **ir**, iris ; **m**, muscle ; **re**, rétine.

**Nous avons observé une installation progressive des iridophores au cours du développement. La distribution de l'iridescence observée sur les embryons est en accord avec l'agencement des iridophores décrite chez le nouveau-né (Hanlon et Messenger, 1988). la disposition des amas (Fig. 59G) présente, entre autres, des similitudes intéressantes avec la répartition de papilles de la peau du juvénile (Allen & al., 2009). Mais tous les iridophores ne sont pas mis en place au cours de l'embryogénèse. L'absence d'iridescence sur la partie ventrale de l'embryon démontre qu'une phase importante du développement des iridophores chez *S. officinalis* a lieu chez le juvénile.**

## 2.2 Recherche et caractérisation des différents gènes de réflectine chez *S. officinalis*

Les nanostructures des iridophores responsables de l'iridescence sont constituées de protéines. Cette famille de protéines est caractérisée par la répétition de cinq séquences renfermant chacune un sous domaine hautement conservé (SD, Fig. 62). Au tout début de mon travail de thèse chez *S. officinalis*, la connaissance de la diversité génétique des réflectines se limitait à quelques données disparates et de natures différentes, chez trois espèces : « 6 gènes de réflectine » identifiés dans l'organe lumineux d'*Euprymna scolopes* (Crookes *et al.*, 2004), « 2 isoformes de réflectine » caractérisées chez *Doryteuthis pealeii* (Izumi *et al.*, 2009) et une séquence de "protéine à répétitions riches en méthionine qui montre des similitudes avec les séquences de la réflectine », trouvée dans l'œil du calmar *Loligo forbesi* (Weiss *et al.*, 2005). Nous nous sommes donc posés la question de la diversité qualitative et quantitative de cette famille de protéines chez *S. officinalis*.



**Figure 62.** Schéma conceptuel des ARNm de réflectine d'*Euprymna scolopes* (d'après Crookes *et al.*, 2004). Les rectangles gris représentent les séquences répétées et les rectangles hachurés représentent les sous domaines (SD) très conservés [M/FD(X)<sub>5</sub>MD(X)<sub>5</sub>MD(X)<sub>3/4</sub>].

### Première étape : Analyse *in silico* de la banque EST

Une analyse *in silico* a été réalisée sur la banque d'EST embryonnaires (stades 16 à 28) que nous avons obtenue au cours de mon travail de thèse dans l'équipe. Le regroupement automatique et manuel des différentes séquences de réflectines de la base de données a permis d'identifier 12 « contigs », c'est-à-dire 12 séquences « reconstruites » d'ADNc différentes. L'analyse précise de ces séquences, et le regroupement entre-elles des séquences ayant plus de 93% d'identité, nous a permis de dégager six groupes de contigs correspondant donc à **six formes potentielles de réflectines chez *S. officinalis*** (ayant donc plus de 7% de différences entre elles). Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'une publication (**article n° 3**).

## Deuxième étape : recherche des six formes au sein d'ADNc

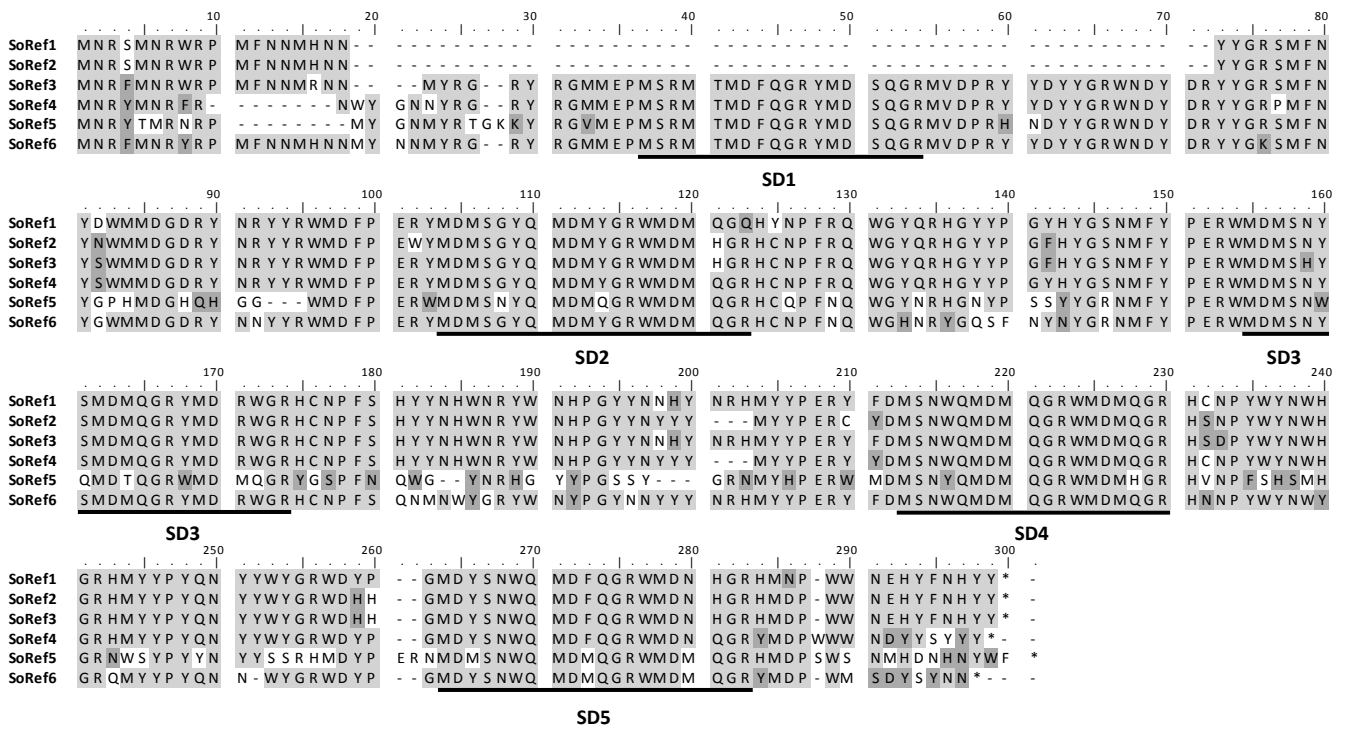
Après ce travail sur la banque EST, j'ai voulu confirmer l'existence, en nombre et en qualité des formes potentielles obtenues. En m'appuyant sur ces séquences, j'ai dessiné des amorces spécifiques à *Sepia officinalis* (Table 1).

**Table 1. Amorces spécifiques destinées à amplifier les six formes de rélectines déduites de la banque EST.**

Séquence des amorces (5'–3')	<i>T<sub>m</sub></i> (°C)	Taille amplicon (bp)	Nom du gène
Fw : ATGAATCGTTATACGATGAGGAA Rev: CGAGATGAACGGTGAGAGGT	57,7 64,3	855	<i>SoRef5</i>
Fw : GAAACCACCATGAACCGCTC Rev: GCAATTCGCGATGTCTTATT	66,7 62,8	720	<i>SoRef2</i>
Fw : AACCGCTTCATGAACAGATACC Rev: TTGTTATAGGAATAATCACTCATCCA	58,4 61,3	876	<i>SoRef6</i>
Fw : CCCGCTGCTTAGACTTCATT Rev: CCGGATTCAGCATCTTCTTC	63,2 63,6	873	<i>SoRef3</i>
Fw : ACCGCTTCATGAACAGATGG Rev: AAGTAATGCTCGTTCACCAA	65 63,3	729, 852	<i>SoRef1, SoRef4</i>

Des amplifications par PCR ont été réalisées sur l'ADNc obtenu à partir d'un pool d'ARN extrait d'embryons de *S. officinalis* aux différents stades de l'organogénèse. Après clonage et séquençage des produits de PCR, un grand nombre de séquences de tailles équivalentes (plus de six) a été obtenu. Ces séquences ont été identifiées comme des séquences de rélectine après alignement avec les séquences de rélectine déjà publiées. La diversité des séquences obtenues a potentiellement quatre causes possibles, non exclusives les unes des autres. Elles peuvent être issues 1) de gènes différents qui produisent des ARNm de séquences primaires différentes; 2) de processus d'épissage alternatif (séquence secondaire); 3) d'allèles différents pour chaque gène ; 4) d'erreurs de séquençage. Afin de faire le tri au sein des séquences et de pouvoir en dégager de l'information, j'ai décidé de ne conserver qu'une séquence parmi celles qui avaient plus de 95% d'identité entre elles. J'ai, en effet, fait l'hypothèse que les causes 3) et 4) étaient à l'origine de cette variation de 5% de différences entre elles. En appliquant ce critère, **six séquences de rélectines (différentes entre elles à plus de 5%)** ont été identifiées et que j'ai nommé SoRef1 à SoRef6 (Fig. 63).

Ces séquences présentent bien toutes le motif riche en méthionine, caractéristique des rélectines et identifié par Crookes *et al.* en 2004. Cependant, deux séquences de *S. officinalis*, SoRef1 et SoRef2, présentent une particularité par rapport aux séquences d'*E. scolopes*, elle ne possède que quatre répétitions du motif. Les quatre autres séquences, SoRef3, SoRef4, SoRef5 et SoRef6, sont concordantes avec celles d'*E. scolopes* avec cinq répétitions du motif (SD, Fig. 63). Comme pour l'analyse des EST, on retrouve six formes de rélectines qui présentent, entre-elles, des pourcentages d'identités allant de 57% à 95% (Table 2).



**Figure 63. Séquences en acides aminés des 6 formes de réflectines chez *S. officinalis*, traduites à partir des six séquences amplifiées en ADNc. A chaque position, les acides aminés identiques sont en gris clair et les acides aminés similaires sont en gris foncé. SD : Sous Domaines conservés.**

**Table 2. Matrices des pourcentages d'identités en nucléotide (haut) et en acides aminés (bas) entre les 6 formes de réflectines chez *S. officinalis*.**

	SoRef1	SoRef2	SoRef3	SoRef4	SoRef5	SoRef6
SoRef1	-					
SoRef2	93 94.93	-				
SoRef3	88.48 81.03	88.48 80.64	-			
SoRef4	85.19 88	85.83 89.53	89 92.08	-		
SoRef5	58.54 67.92	57.44 68.95	64.29 73.63	66.21 73.40	-	
SoRef6	75.10 81.53	73.03 79.74	82.85 86.25	81.57 83.09	65.41 73.03	-

### Troisième étape : recherche de séquences dans de l'ADN génomique

Afin de déterminer la part de la diversité génétique (cause 1) et la part d'épissage alternatif (cause 2) pour expliquer l'existence de ces différentes formes, j'ai utilisé les mêmes amorces que pour les PCR sur ADNc et effectué, cette fois, des PCR sur de l'ADN génomique. J'ai amplifié six séquences génomiques correspondant chacune à une des six séquences d'ADNc. La très grande similarité - en séquence et en longueur - de ces séquences (entre 98% et 100% de similitude, cf. **annexe A6**), nous a dès lors permis d'affirmer que ***S. officinalis* possède au moins six gènes différents de réfectine, sans intron et donc sans phénomène d'épissage alternatif**. Enfin, dans l'intérêt de confirmer l'hypothèse de variations alléliques pouvant expliquer les séquences identiques à plus de 95%, les six formes de réfectines ont été recherchées par PCR dans l'ADN génomique d'individus différents. Dans chaque génome individuel, je n'ai jamais obtenu plus de deux variants de chacune des formes de réfectine SofRef1 à SofRef6 (plus de 95% d'identité), ce qui conforte cette hypothèse.

L'ensemble de ces travaux, publié dans l'**article n° 4**, démontre que *S. officinalis* possède **au moins six gènes sans intron** tout comme *Euprymna scolopes* (Crooke *et al.* 2004). Cependant, il n'est pas impossible que les ARNm issus d'autres gènes aient pu ne pas être trouvés. Je pense toutefois qu'ayant dessiné des amorces au niveau des motifs répétés des réfectines, les PCR ont certainement amplifié une très grande proportion des différents ARNm de réfectine. Mon étude suggère donc fortement la présence d'au moins **six gènes différents de réfectine chez *S. officinalis***.



## 2.3 La dynamique de développement des iridophores chez *S. officinalis*

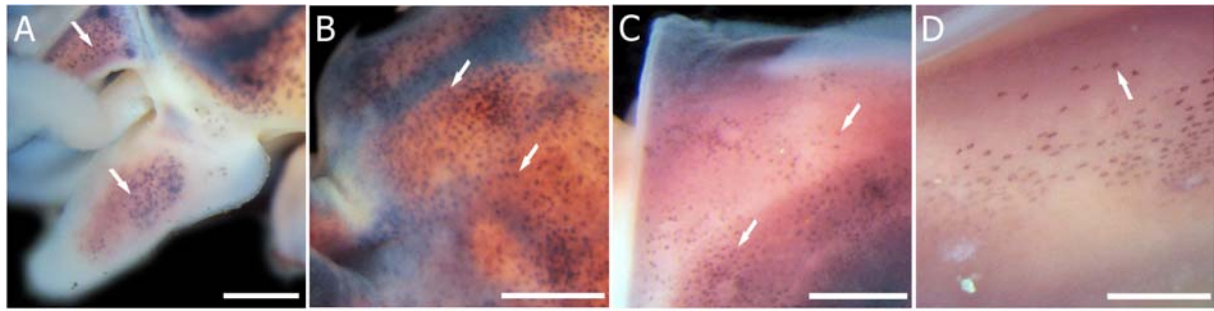
Les gènes de réflectines identifiés s'expriment très vraisemblablement au cours de l'embryogénèse dans la mesure où leurs séquences ont pu être détectées dans des extraits d'ARNm embryonnaire. Nous avons voulu savoir quand et où ces gènes s'expriment au cours du développement embryonnaire. Avant toutefois de chercher à expliquer la présence de six formes de réflectines différentes chez la seiche et les fonctions éventuelles de chacune de ces six formes, j'ai donc engagé un premier travail descriptif pour confirmer que l'expression de ces gènes permettait effectivement de suivre précisément la dynamique de développement des iridophores.

### Une première approche globale : utilisation d'une sonde consensus

Afin d'obtenir une première analyse spatio-temporelle de la transcription des réflectines, j'ai utilisé une sonde ARN anti-sens (longueur de 411 nucléotides) synthétisée à partir de l'ADNc de SoRef3. Le choix de ce gène est à la fois historique (c'est le premier gène que nous avons séquencé) et stratégique (la portion du gène choisie pour réaliser la sonde est très proche en séquence des autres gènes, cf. **annexe A9**). En utilisant cette sonde anti-sens (nommée ici AS-3) au cours des différents stades de développement, j'ai réalisé des hybridations *in situ* préliminaires afin de valider mon protocole expérimental. Mon objectif était donc davantage de repérer le plus d'iridophores en développement possible que d'obtenir le patron d'expression spécifique de tel ou tel gène de réflectine (SoRef3 en l'occurrence ici). Les résultats obtenus par ce travail ont été publiés dans l'**article n°4**. Contrairement à la publication, les résultats d'expression seront présentés ici, non pas par organes, mais par motifs d'organisations cellulaires. Tout comme pour l'étude des chromatophores, l'analyse des organisations cellulaires peut en effet donner des indices pour inférer des hypothèses quant aux mécanismes moléculaires sous-jacents. Ainsi, l'isolement de cellules peut faire penser à des phénomènes de répulsion, l'organisation d'amas ou de tapis cellulaires peuvent faire penser à des phénomènes de multiplication clonale et l'organisation en ligne peut signifier l'intervention de molécules chimio-répulsives ou inhibitrices (Meinhardt & Gierer, 1974).

### Des expressions au sein de cellules isolées

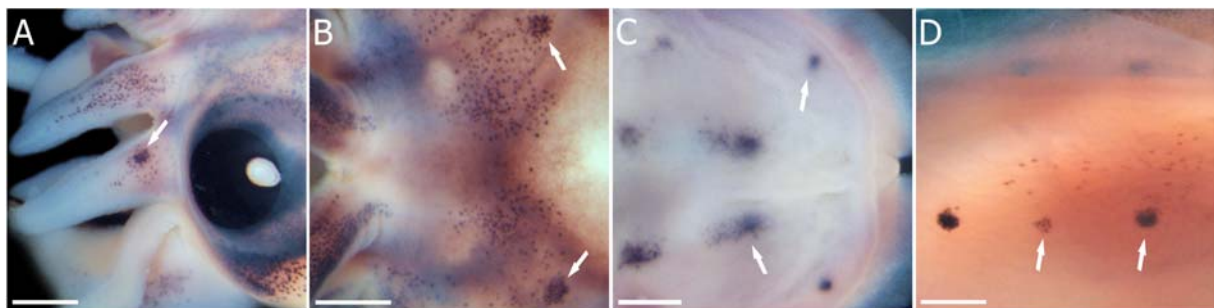
Une grande majorité des cellules détectées lors de ces hybridations *in situ* étaient des cellules isolées, réparties sur toute la surface de la peau (le manteau, la tête et les bras) (**Fig. 64**). La répartition de ces cellules est identique à la répartition des points d'iridescence décrite plus haut.



**Figure 64. Différents exemples de développement d'iridophores isolés.** **A**, au niveau des bras. **B**, au niveau de la tête. **C**, au niveau du côté dorsal du manteau. **D**, au niveau du côté latéral gauche du manteau. Les flèches blanches indiquent les iridophores. Barres d'échelle = 500µm

#### Des expressions au sein d'amas de cellules

Des amas de cellules positives ont été détectés tout au long du développement (**Fig. 65**). Elles correspondent également aux différentes zones iridescentes en amas observées chez l'embryon vivant.

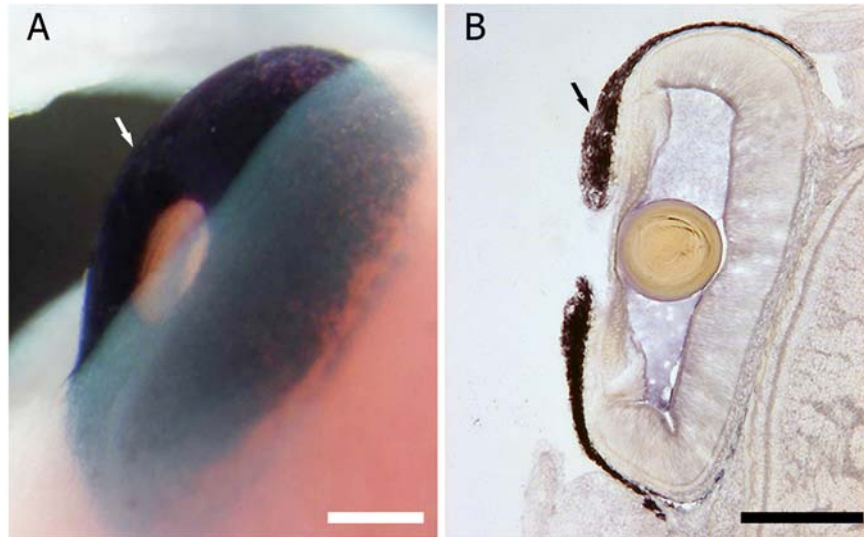


**Figure 65. Différents exemples de développement d'iridophores regroupés en amas.** **A**, au niveau des bras. **B**, au niveau de la tête. **C**, au niveau du côté dorsal du manteau. **D**, au niveau du côté latéral droit du manteau. Les flèches blanches indiquent les amas. Barres d'échelles = 500µm

La localisation de ces amas de cellules est similaire à la répartition des papilles de peau observée chez les juvéniles (Hanlon & Messenger, 1988), où ces papilles sont présentes en grand nombre sur toute la face dorsale des bras, de la tête et du manteau et sur le côté latéral du manteau (Hanlon & Messenger, 1988; Allen *et al.*, 2009). L'expression des réflectines que nous avons observée confirme la présence d'iridophores dès le développement embryonnaire au sommet de chaque future papille, ce qui avait été suggéré dans plusieurs études précédentes (Hanlon & Messenger, 1988; Messenger, 2001).

### Des expressions au sein de tapis de cellules

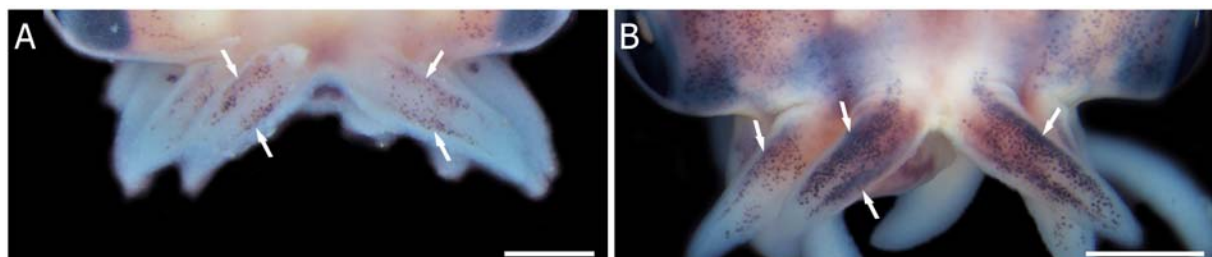
Dans les yeux et surtout au niveau de l'iris, l'expression des réflectines démontre un développement massif et uniforme d'iridophores comme l'observation des embryons vivants le laissait supposer (Fig. 66).



**Figure 66.** Illustrations du développement d'iridophores au sein de l'œil en formation de *S. officinalis*. **A**, vue extérieure au stade 26. **B**, coupe frontale au stade 26. Barres d'échelles : **A** = 200µm; **B** = 250µm

### Des expressions en lignes

Une organisation en ligne de l'expression des réflectines a été observée au niveau des bras (Fig. 67). Les premières cellules produisant des ARNm de réflectine sur les bras 1, 2 et 3 semblent former des lignes à partir du stade 26. Ces lignes sont visibles jusqu'au stade 28 puis disparaissent dans la multiplication des cellules positives. Ces lignes correspondent aux lignes irisées s'étendant longitudinalement sur les bras 1, 2 et 3 à l'éclosion et que l'on retrouve chez l'adulte et le juvénile (Hanlon & Messenger, 1988 ; Mäthger *et al.*, 2009a).

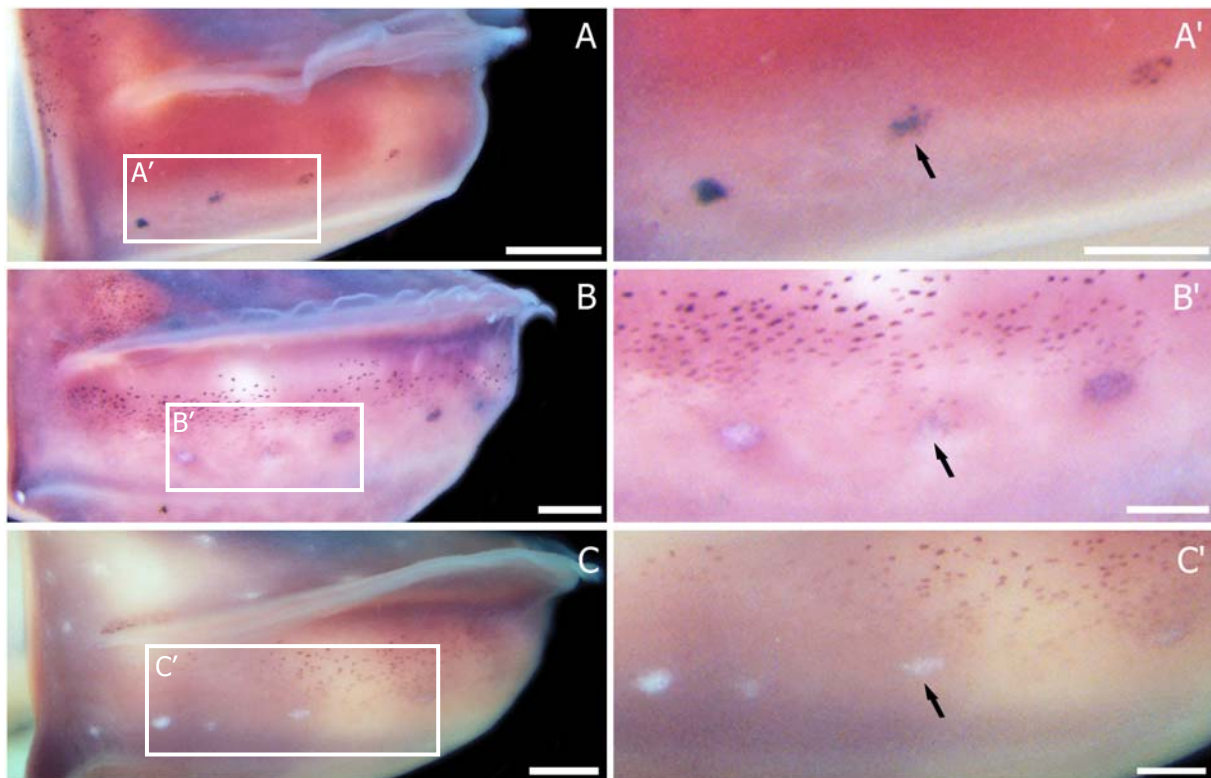


**Figure 67.** Illustrations du développement d'iridophores en lignes (flèches blanches) au niveau des bras en formation de *S. officinalis*. **A**, stade 27. **B**, stade 29. Barres d'échelles = 1mm.

### Interprétation et discussion

Les patrons d'expression des réflectines correspondent parfaitement et exclusivement aux motifs d'iridescence détectés sur les embryons vivants (cf. 2.1). L'iridescence étant le témoin de la présence des iridophores, nous avons donc pu confirmer que **les réflectines permettent bien de détecter spécifiquement le développement des iridophores.**

L'analyse précise de la chronologie, et de l'évolution des marquages, nous a également révélé que pour chaque motif (c'est-à-dire à une localisation donnée) **la transcription des ARNm de réflectines s'étend sur une durée de 3 stades environ puis semble cesser totalement.** Les marquages obtenus lors des hybridations *in situ* ont en effet tous fini par laisser place à des motifs à l'aspect blanchâtre (parfois jaunâtre selon l'angle d'observation), aspect très vraisemblablement révélateur de la présence de protéines de réflectines (**Fig. 68**).



**Figure 68.** Illustration de la chronologie de l'expression de réflectine au niveau des iridophores en amas, sur le côté latéral gauche du manteau chez *S. officinalis*. **A-A'**, Stade 27. **B-B'**, Stade 29. **C-C'**, Stade 30. Barres d'échelles : **A, B, C** = 1mm ; **A', B', C'** = 300µm

Il est difficile de déterminer si la production d'ARNm cesse totalement, ou non, au terme de ces trois stades d'expression. Il reste en effet possible que des ARNm soient toujours transcrits. Ils seraient peut-être produits en plus faible quantité, ou bien ils deviennent plus difficiles à hybrider une fois de grandes quantités de réflectines présentes dans les iridophores. Concernant cette dynamique d'expression, un travail spécifique sur la durée de vie des ARNm et des protéines de réflectines

pourrait être engagé. Il peut exister un contrôle cellulaire temporel de l'expression. A plus grande échelle, c'est-à-dire en considérant l'embryon dans sa totalité, la transcription des ARNm de réflectine continue jusqu'à l'éclosion, il y a apparition constante de nouveaux iridophores.

Par ce travail, nous avons pu confirmer que les réflectines sont bien exprimées au cours du développement et qu'elles permettent de suivre la distribution spatio-temporelle des iridophores. Mais plusieurs formes de réflectines sont présentes chez *Sepia officinalis*, se pose alors la question du rôle de chacune de ces formes. Elles participent peut être toutes ensemble à l'élaboration des plaques des réflecteurs multicouches au sein d'un même iridophore, ou alors *S. officinalis* possède peut être des iridophores réflectine-spécifique. De même, il peut exister une spécificité en fonction des tissus ou de la localisation dans l'organisme. Tous les iridophores produisent de l'iridescence mais certains sont connus pour polariser la lumière (Shashar *et al.*, 1996). Cette fonction particulière correspond peut être à une réflectine donnée ou à un assemblage particulier de plusieurs réflectines. Pour tester ces hypothèses, il faut pouvoir discriminer les patrons d'expression des différentes formes de réflectine.

#### Questions additionnelles

Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la mise en place des différents motifs d'iridophores restent inconnus. Ce travail préliminaire démontre néanmoins que le développement des iridophores est un modèle d'étude pertinent pour travailler sur la question plus large du développement de motifs chez *S. officinalis*. En effet, il s'agit d'un des rares cas de motifs colorés où l'investigation génétique peut se faire directement sur la structure colorée elle-même –les réflectines– et non de façon indirecte sur les enzymes de la voie de synthèse (cf. mélanine des vertébrés). Dans le cas du motif de type « amas » par exemple, l'augmentation de la taille de ces amas au cours du développement pose la question du mécanisme de production des nouveaux iridophores. Les iridophores d'un même amas sont-ils issus d'un même iridophore-précurseur dont les cellules filles s'engagent dans la voie de différenciation en iridophores (hypothèse clonale) ou bien des phénomènes locaux de contact se mettent-ils en place pour recruter et engager des cellules voisines et « naïves » dans cette voie de différenciation?

## 2.4 La recherche de spécificités développementales des six gènes de réflectine

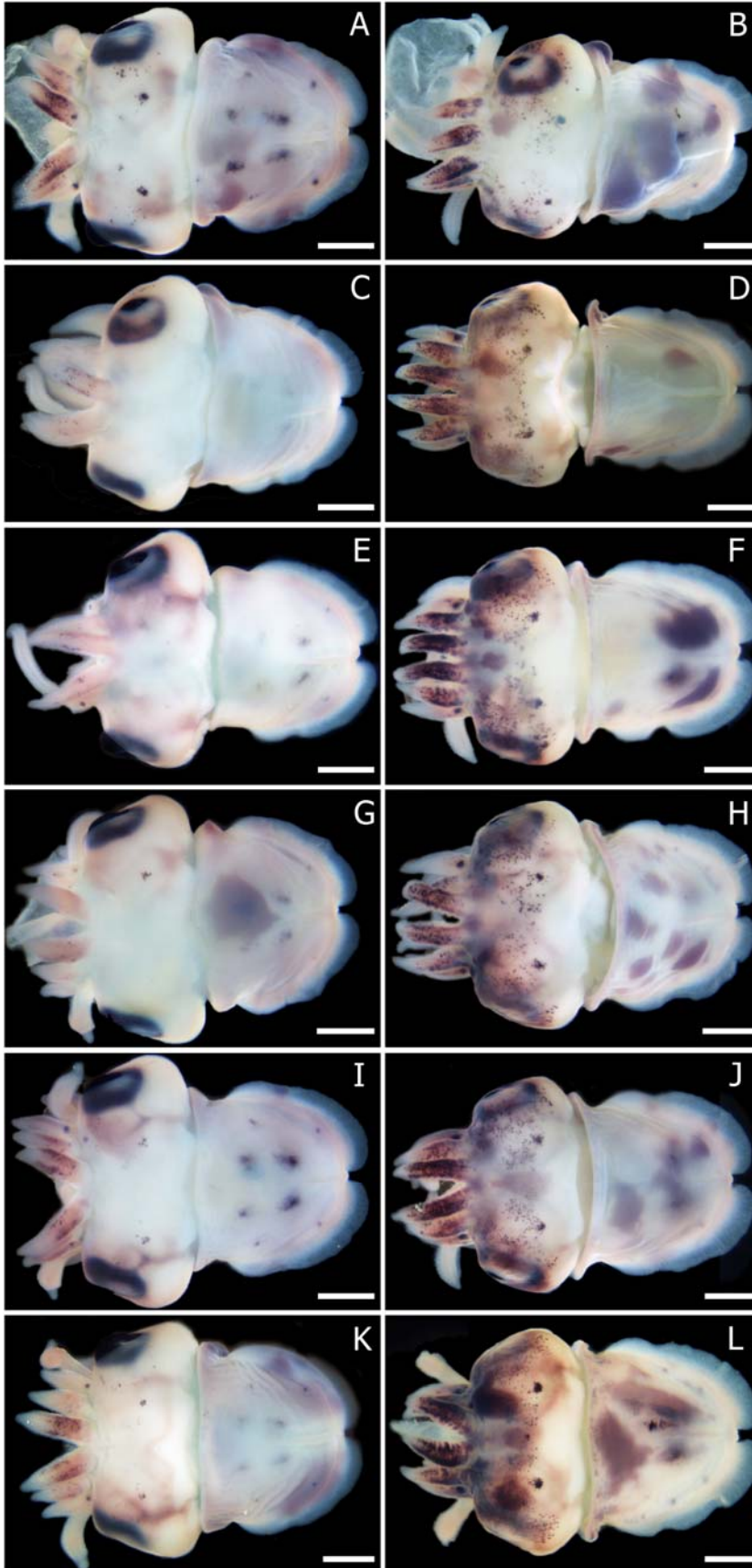
L'analyse descriptive précédente ne fait pas de distinction particulière entre les six gènes de réflectine de *Sepia officinalis*, même s'il est vraisemblable qu'il s'agisse de l'expression du gène *SoRef3* qui a constitué l'essentiel des marquages obtenus (sonde AS-3). Ainsi, il nous a semblé nécessaire d'évaluer l'hypothèse d'une expression différentielle des différents gènes de réflectine que ce soit dans le temps et/ou entre les différentes structures iridescentes. Il est en effet possible que l'iridescence des différentes structures soit de nature optique différente, et que la diversité des formes de réflectines soit impliquée dans cette diversité.

### Recherche de spécificités temporelles et/ou tissulaires

Afin de voir s'il existe des différences entre les patrons de transcription d'ARNm des différentes formes de réflectine, des hybridations *in situ* ont été effectuées avec une sonde pour chacune des formes de réflectine. Pour chaque sonde, l'hybridation *in situ* a été réalisée sur deux embryons à des stades différents, un stade 26-27 et un stade 28. Les résultats obtenus sont résumés dans la **figure 69**. Ils *semblent* démontrer qu'**aucun des six gènes de réflectines ne présentent une expression différente des autres que ce soit dans le temps et/ou dans sa distribution spatiale**. Tous les territoires où nous avons pu observer que 1) des iridophores se développent et que 2) des phénomènes d'iridescences apparaissent semblent exprimer la totalité des six formes génétiques.

Ce résultat est cohérent avec des études précédentes qui ont montrées que différentes formes de réflectines peuvent être exprimées au sein d'un même organe : comme dans l'organe lumineux d'*Euprymna scolopes* (Crookes *et al.*, 2004) ou dans la peau de *Dorytheutis pealeii* (Izumi *et al.*, 2009). Des précautions doivent néanmoins être prises pour pouvoir interpréter nos propres résultats. En particulier, deux hypothèses ont du être testées avant de pouvoir poursuivre la discussion :

- 1) les six sondes anti-sens que nous avons dessinées (AS-1 à AS-6) ne sont peut-être pas spécifiques des seuls ARNm produits par le gène auquel elles correspondent. La très forte similarité des séquences des six gènes de réflectine, ainsi que la présence de motifs répétés hautement conservés, peuvent en effet faire que la sonde AS-4, par exemple, s'hybride non seulement aux ARNm produits par le gène *SoRef4* mais aussi à ceux d'autres gènes (*SoRef3* et *SoRef5* par exemple).
- 2) à une échelle plus fine, il existe peut-être des différences d'expressions entre les gènes que nous n'avons pas pu détecter à l'échelle globale de l'embryon (entre les cellules d'une même structure iridescente par exemple) ;



**Figure 69. Expression des six formes de réflectine.** A-B, *SoRef1* ; C-D, *Soref2* ; E-F, *SoRef3* ; G-H, *SoRef4* ; I-J, *SoRef5* ; K-L, *SoRef6*. A, C, E, G, I, K stade 26-27 ; B, D, F, H, J, L stade 28. Barres d'échelle = 1mm.

Les différences observées entre les embryons du stade 26-27 ne sont pas dues à des différences d'expression mais plutôt à de légères différences de développement entre les embryons.

De plus, le marquage est peu visible sur le côté dorsal du manteau des stades 28, car les manteaux présentent de nombreuses boursouflures et un voile blanc sur le dessus qui gêne l'observation. Ceci est sûrement dû à un problème de fixation.

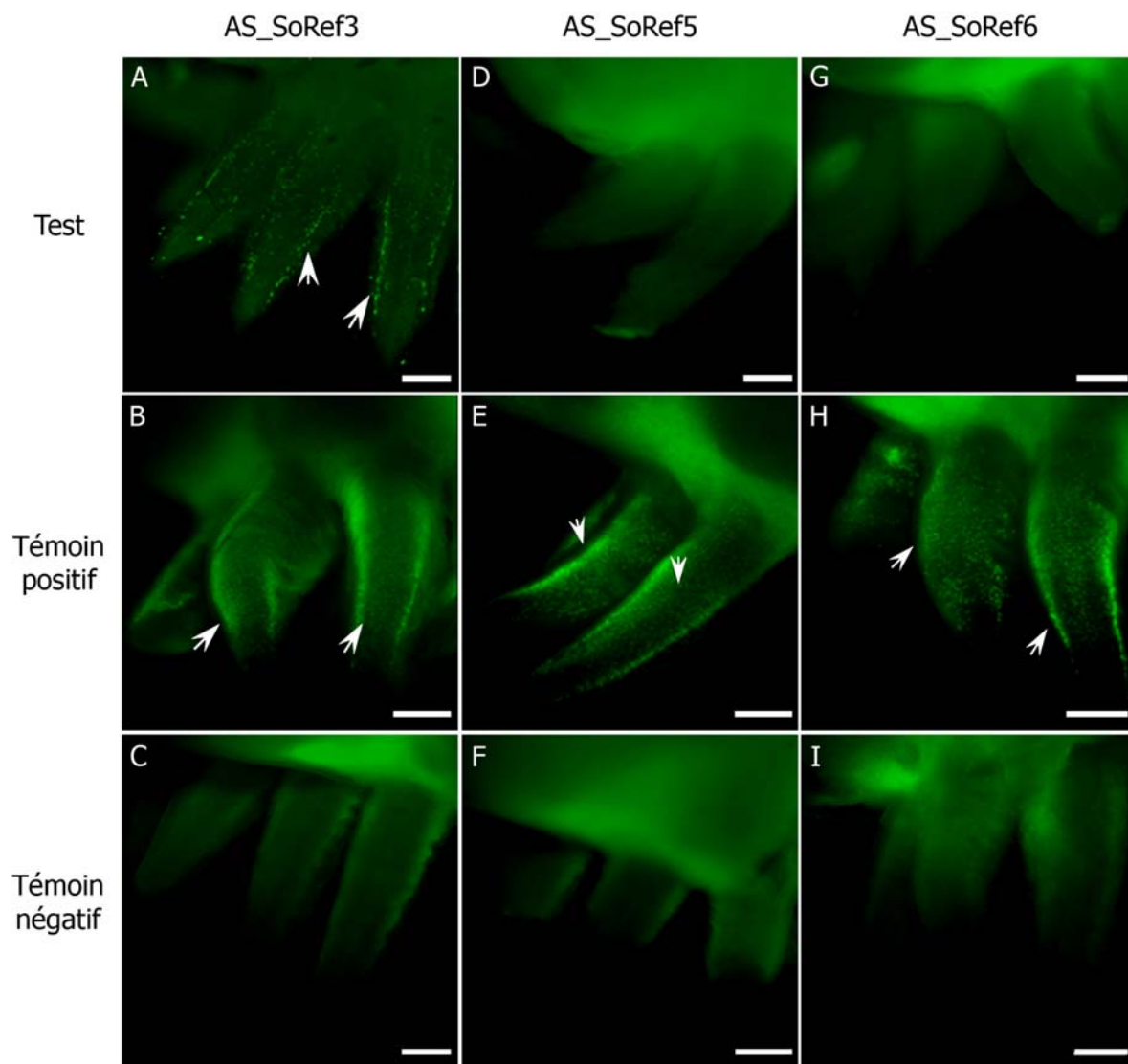
### Test de la spécificité de 3 sondes anti-sens

J'ai cherché à tester la spécificité de trois des six sondes synthétisées, en mettant au point une expérience d'hybridation compétitive, validée et publiée dans l'**article n°4**. Les sondes AS-3, AS-5 et AS-6 représentant les séquences les plus proches (AS-3/AS-5 : 78% ; AS-3/AS-6 : 90% ; AS-5/AS-6 : 83%) et spécifiques de la même zone sur les ARNm (cf. **annexe A9**) ont été utilisées dans ce test. Pour le test de spécificité de chacune des sondes, les trois expériences suivantes ont été réalisées :

- *un témoin positif* : il s'agit de l'hybridation *in situ* avec la seule sonde anti-sens (ex : AS-6). Cette hybridation doit donner un signal, la sonde étant censée s'hybrider au minimum avec les ARNm du gène correspondant (ici *SoRef6*).
- *un témoin négatif* : il s'agit d'une hybridation *in situ* avec la sonde anti-sens et la sonde sens correspondante en même quantité (ex : AS-6 et S-6). Dans cette hybridation, les deux sondes sont censées s'inter-hybrider, être éliminées aux premiers rinçages et donc ne donner aucun signal dans l'embryon.
- *le test de spécificité à proprement parler* : dans cette hybridation *in situ*, la sonde anti-sens testée (ex : AS-6) est mise en présence des sondes sens des deux autres formes (dans l'exemple : S-3 et S-5). Si l'embryon présente un marquage, cela signifie que la sonde AS n'a pas pu s'hybrider avec les sondes sens : elle n'a donc pas la capacité de s'hybrider avec les mêmes cibles que celle des 2 autres sondes AS (ici on conclurait que AS-6 ne reconnaît pas les mêmes cibles que les sondes AS-3 et/ou AS-5). Si au contraire, l'embryon ne présente aucun marquage, cela signifie que la sonde AS s'est hybridée avec au moins l'une des sondes sens et donc que cette sonde a potentiellement les mêmes cibles que les 2 autres sondes AS.

Les résultats de ces tests ont été validés par des témoins positifs et négatifs cohérents : seul le test de spécificité de la sonde AS-3 est positif (**Fig. 70**). Nous démontrons ainsi que AS-5 et AS-6 sont capables de reconnaître le même ensemble de cibles alors que AS-3 reconnaît des cibles qui lui sont propres (différentes en tout cas de celles de AS-5 et AS-6).





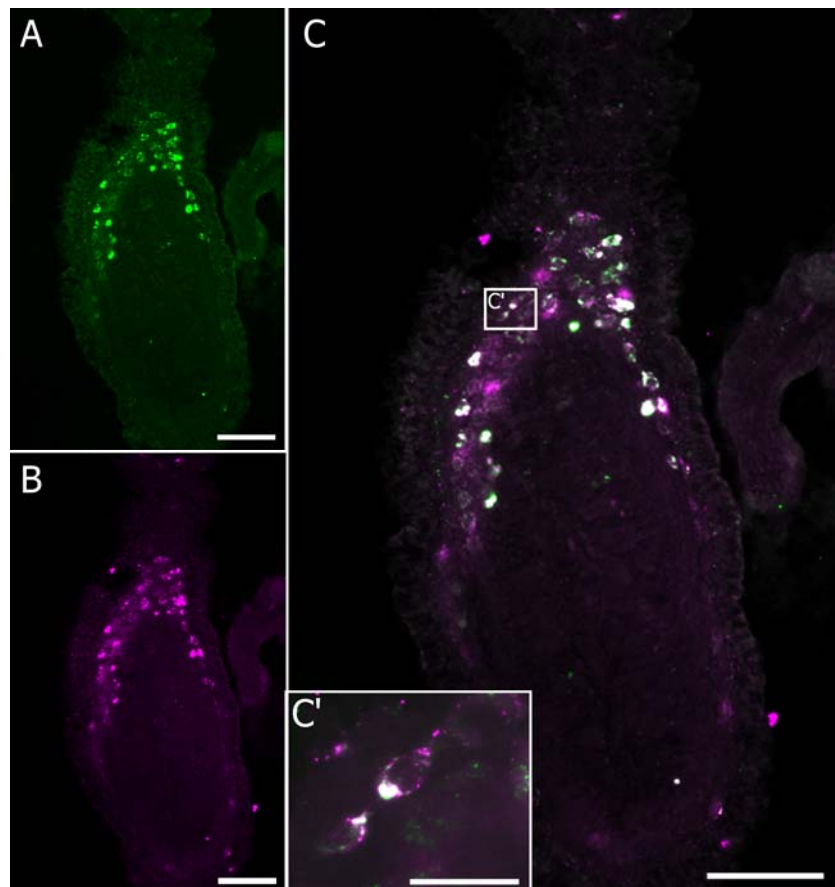
**Figure. 70. Test de spécificité des sondes par hybridation *in situ* fluorescente.** Focus sur les bras au stade 27. Les flèches indiquent les cellules positives. **A-C**, test de la sonde AS-3 ; **D-F**, Test de la sonde AS-5 ; **G-I**, test de la sonde AS-6. Barres d'échelle = 300µm.

Ce travail sur la spécificité des sondes permet de discuter les conclusions proposées suite aux résultats de la **figure 69**. Certaines similarités d'expression pourraient être en réalité le fait de sondes anti-sens trop peu spécifiques. Par notre test de spécificité, nous apportons la preuve que les sondes AS-5 et AS-6, par exemple, ont la possibilité de s'hybrider aux mêmes cibles et donc, se faisant, de fournir des patrons d'expression en apparence similaires. Par contre, la sonde AS-3 s'hybride à des cibles différentes mais présentent le même patron d'expression que les autres, il semblerait donc qu'il y ait plusieurs réfectines situées au même endroit. Différents cas de figures sont possibles, soit des iridophores réfectine-spécifiques sont localisés au même endroit, soit différents types de réfectines

sont présentes au sein même d'un iridophore. Nous allons tenter de répondre en affinant la recherche à l'échelle cellulaire (hypothèse 2).

#### Recherche de spécificités cellulaires

Afin de tester l'hypothèse 2), nous avons utilisé des sondes ayant des cibles différentes. Nous avons ainsi choisi de comparer en double hybridation fluorescente les expressions fournies par les sondes AS-3 et AS-5. Les résultats de ce travail (**article n°4**) révèlent qu'à l'échelle des tissus et des cellules, les patrons d'expressions sont très similaires (**Fig. 71**).



**Figure 71. Double hybridation in situ fluorescente sur coupe de bras d'embryon au stade 26.** A- hybridation avec la sonde AS-3 ; B- hybridation avec la sonde AS-5 ; C- C' le chevauchement des deux signaux apparaît blanc. Barres d'échelle : A, B, C = 100µm ; C' = 20µm.

Ces résultats démontrent que **des cellules sont capables d'exprimer différentes formes de réflectine** quelle que soit la zone observée (des coupes passant par les bras, les yeux et la peau du manteau ont montré les mêmes patrons de signaux). Localement certaines cellules semblent exprimer un seul type de cibles (celles d'AS-3 ou d'AS-5), mais il ne se dégage pas de ces résultats de spécificité d'une forme de réflectine pour un organe ou un tissu particulier. L'hypothèse de non-

spécificité de l'expression des gènes de réflectine pressentie à l'échelle de l'embryon (**Fig. 69**) semble se confirmer à l'échelle locale et cellulaire.

### Interprétations et perspectives

De nouvelles sondes ainsi que de nouveaux tests de spécificité devront être réalisés pour réussir à obtenir, pour chacun des gènes de réflectine, une sonde réellement spécifique qui permettra de résoudre définitivement la question de la probable non-spécificité tissulaire de ces gènes. Pour le moment, nous pouvons d'ores-et-déjà affirmer que **des réflectines différentes peuvent être exprimées dans les mêmes parties du corps, dans les mêmes structures et dans les mêmes iridophores au cours du développement embryonnaire**. S'il existe des causes fonctionnelles, physiologiques ou structurales à l'existence de six gènes différents de réflectine, ces causes ne nous apparaissent pas encore clairement. Au niveau cellulaire, nous ignorons si les différentes formes de réflectines exprimées participent à la constitution d'iridosomes distincts et/ou des mêmes iridosomes. Comme les iridosomes sont constitués de réflectines auto-organisées en plaquettes (Kramer *et al.* 2007), il est possible d'imaginer que la diversité des six séquences (avec leurs nombres différents de motifs répétés, par exemple) influence la structure tertiaire et quaternaire des réflectines et donc les propriétés optiques qu'elles confèrent aux iridophores. Seules des analyses biochimiques ou des immunomarquages des différentes formes pourraient apporter une réponse à cette question de l'assemblage intracellulaire des différentes formes de réflectines.

Nos résultats montrent aussi que le pool de réflectines d'un juvénile nouvellement éclos est essentiellement produit avant l'éclosion (**Fig. 68**). L'expression des réflectines semble en effet chuter peu avant l'éclosion (à confirmer en qRT-PCR). La question de la production de nouvelles protéines de réflectines, mais également de nouveaux iridophores au cours de la vie de l'animal reste donc ouverte. Un iridophore qui a cessé de produire des réflectines reprend-t-il la transcription d'ARNm et la traduction de nouvelles protéines ou bien est-il remplacé ? Comment les zones iridescentes accompagnent-elles la croissance de l'animal ? Quels signaux sont responsables de l'induction des territoires iridescents, que ce soit dans l'embryon ou chez l'adulte là où l'iridescence ne se développe qu'après l'éclosion (face ventrale du manteau et bras 4) ?

## 2.5 La phylogénie de la famille des réfléchines chez les céphalopodes : une histoire évolutive complexe

Peu de données existent sur la famille des réfléchines au sein des céphalopodes, six gènes de réfléchine ont été identifiés chez *E. scolopes* (Crookes *et al.* 2004), six gènes chez *S. officinalis* comme nous venons de le voir (**article n°4**), deux séquences d'ADNc dans la peau de *Doryteuthis pealeii* (Izumi *et al.*, 2009) et une séquence d'ADNc dans les yeux de *Loligo forbesi* (Weiss *et al.*, 2005). Aucune donnée n'existe sur les gènes correspondant à ces deux dernières espèces. Ceci constitue une base de données pauvre pour la constitution d'une phylogénie, pour tenter d'établir des scénarios pour expliquer l'histoire évolutive des gènes de réfléchine, et pour comprendre l'origine de la diversité des gènes chez *S. officinalis*.

### Recherche de nouvelles séquences chez d'autres céphalopodes

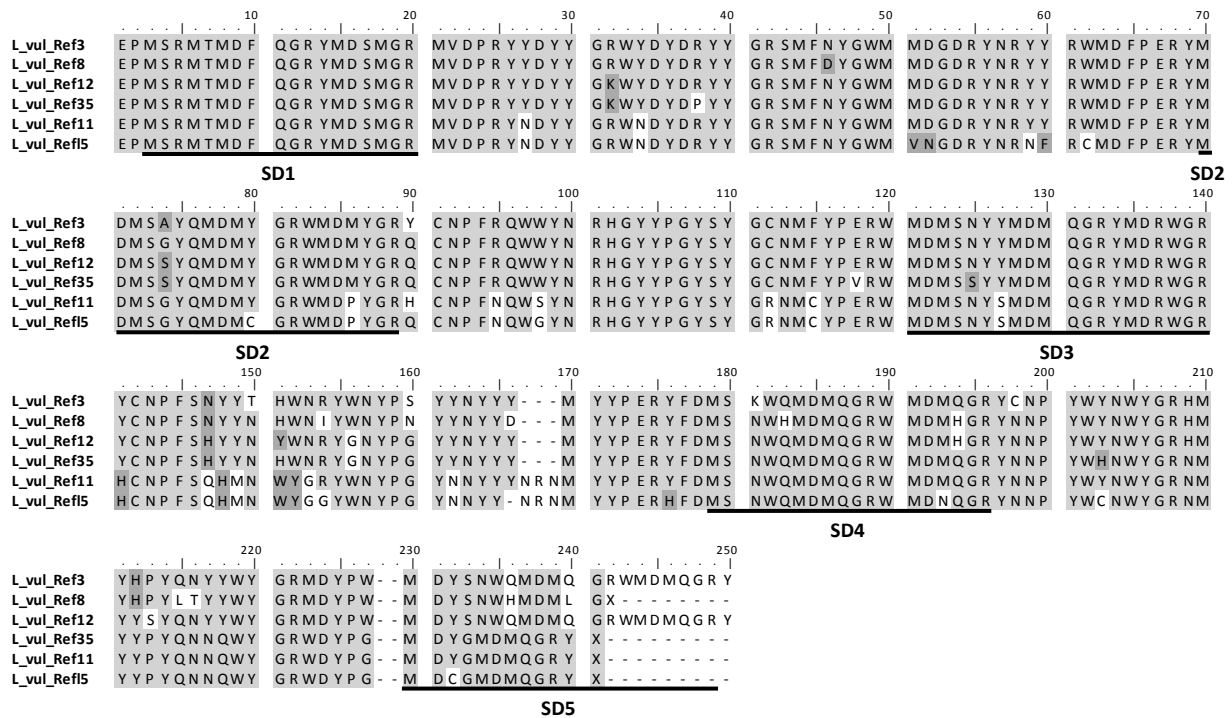
J'ai cherché à agrandir le répertoire de séquences connues de réfléchines en étudiant d'autres espèces de céphalopodes ayant des modes de vie différents et donc potentiellement des réfléchines différentes : une espèce pélagique, *Loligo vulgaris*, pour qui la présence d'iridophores et *a fortiori* de réfléchine est indispensable pour le camouflage (argenture) et pour la communication au sein du banc (polarisation de la lumière par les lignes latérales du manteau) et une espèce benthique, *Octopus vulgaris*, qui se camoufle préférentiellement à l'aide des chromatophores et qui a un mode de vie solitaire. Une première recherche dans des d'ADNc issus d'ARNm d'embryons tardifs de ces deux espèces a été entreprise, à l'aide de couples d'amorces dessinés à partir des séquences de réfléchines connues (citées ci-dessus ; **Table 3**).

**Table 3.** Amorces destinées à amplifier des séquences de réfléchine chez *Loligo vulgaris* et *Octopus vulgaris* et dessinées à partir de régions consensus chez les autres espèces.

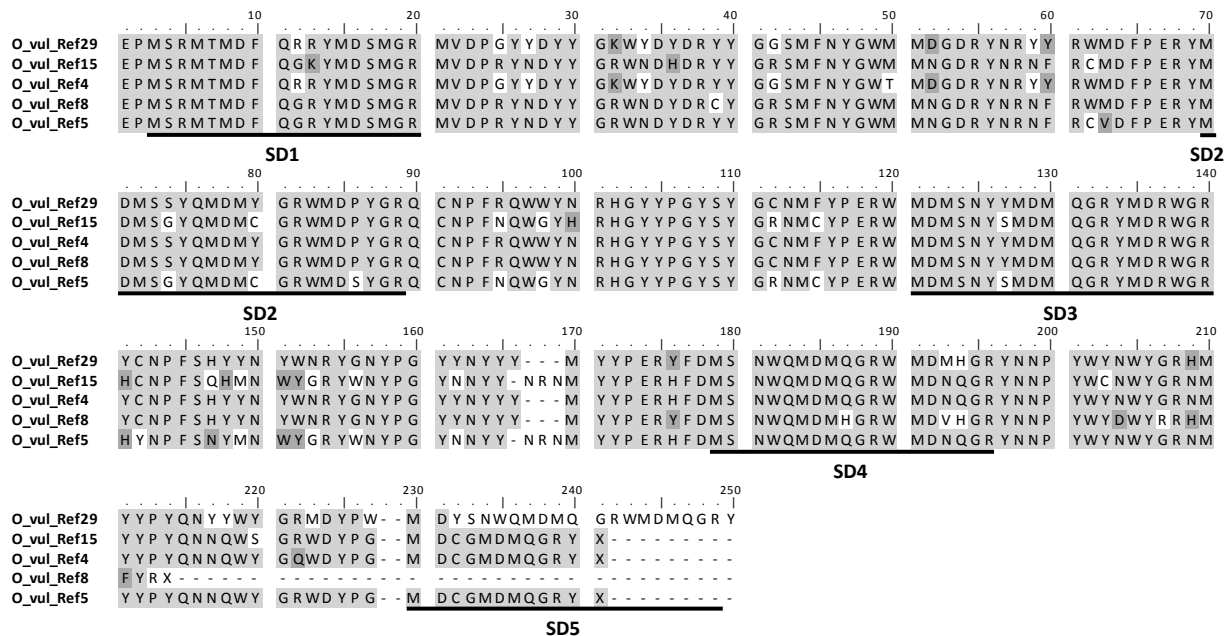
amorces ID	5'–3' Sequence	T <sub>m</sub> (°C)	Taille amplicon (bp)
REF-F1	AGCCAATGTCCAGAATGACC	64	423
REF-R1	CGTAACGTCCCTGCATGTC	64	
REF-F2	CGGAAGGTCCATGTTCAACT	64	362
REF-R2	CGGGAAGCCAGGATAGTAGC	64	
REF-F3	AACCCATGTCCAGAATGACC	64	411
REF-R4	CCTGTCCATGTAGCGTCCTT	64	

De nombreuses séquences partielles de réfléchines ont été obtenues. J'ai effectué des PCR, cette fois-ci avec la série d'amorces qui m'a permis d'obtenir les séquences complètes chez *Sepia officinalis* (**Table 2**), sans succès. Enfin, la technique de RACE-PCR ne m'a pas non plus permis pour l'instant de compléter mes séquences partielles. A l'heure actuelle, j'ai collecté six nouvelles séquences partielles d'ADNc de réfléchine chez *Loligo vulgaris* (**Fig. 72**) et 5 séquences partielles chez *Octopus*

*vulgaris* (Fig. 73). Contrairement aux séquences de *S. officinalis* toutes les séquences obtenues même si elles sont partielles présentent les cinq séquences répétées.

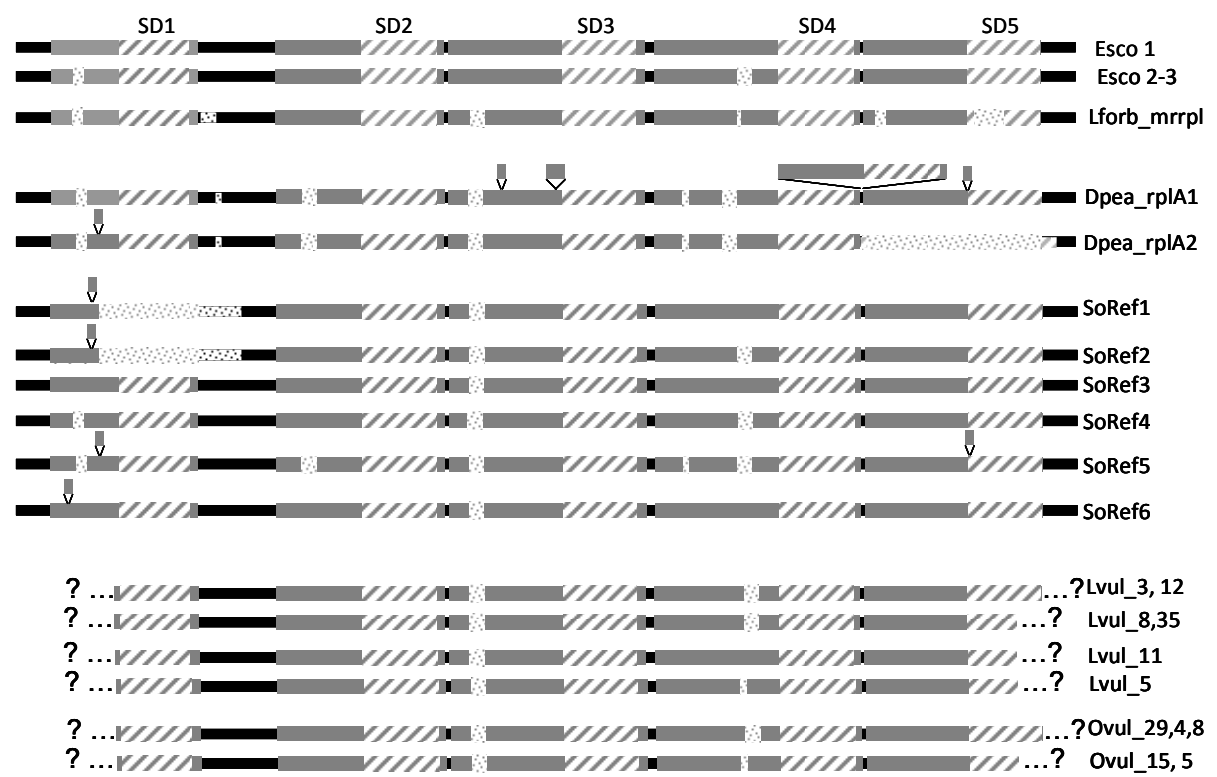


**Figure 72.** Séquences en acides aminés des six formes de réflectines chez *Loligo vulgaris*, traduites à partir des six séquences amplifiées en ADNc. A chaque position, les acides aminés identiques sont en gris clair et les acides aminés similaires sont en gris foncé. **SD** sous domaines conservés.



**Figure 73.** Séquences en acides aminés des cinq formes de réflectines chez *Octopus vulgaris*, traduites à partir des cinq séquences amplifiées en ADNc. A chaque position, les acides aminés identiques sont en gris clair et les acides aminés similaires sont en gris foncé. **SD** sous domaines conservés.

Si toutes les séquences de réfectines sont identifiées par la répétition d'un motif déterminé, le nombre de répétition peut varier entre les différentes formes de réfectine d'une même espèce et entre les espèces chez qui elle a été caractérisée (**Fig. 74**). Chez *Doryteuthis pealeii*, la séquence rplA1 présente six répétitions alors que la seconde séquence rplA2 n'en présente que quatre avec l'absence de la dernière répétition. Cette séquence est différente des séquences SoRef1 et SoRef2 de *Sepia officinalis* qui elle aussi ne renferme que quatre répétitions mais avec cette fois l'absence de la première répétition. Les séquences de *Loligo vulgaris* et *Octopus vulgaris* semblent renfermer cinq répétitions mais les séquences n'étant pas complètes, il est possible qu'elles puissent avoir pour certaines de leurs formes des répétitions supplémentaires.



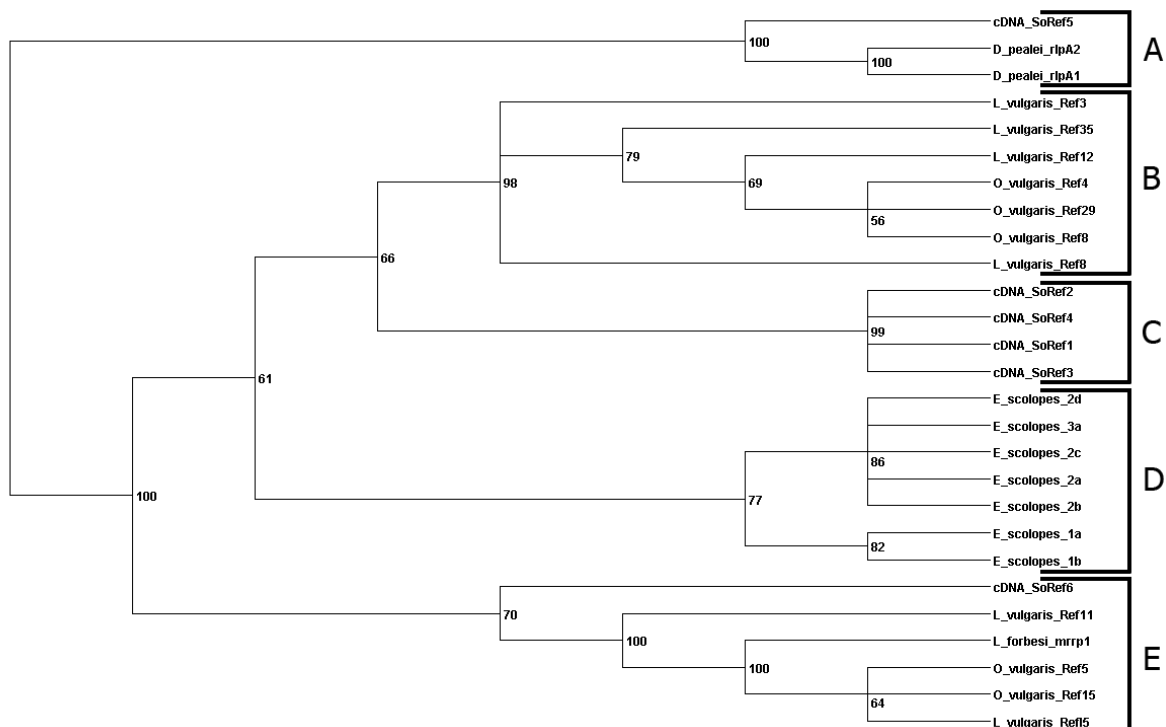
**Figure 74. Comparaison de la structure des séquences de réfectines connues (représentation schématique).** Cette comparaison a été faite en prenant la séquence d'*E. scolopes* 1 (Esco1) comme référence. Les rectangles gris représentent les séquences répétées et les rectangles hachurés représentent les sous domaines (SD) très conservés [M/FD(X)<sub>5</sub>MD(X)<sub>5</sub>MD(X)<sub>3/4</sub>]. Les rectangles blancs indiquent les gaps et les rectangles positionnés sur le dessus indiquent les insertions. **Esco** : *Euprymna scolopes*. **Lfob** : *Loligo forbesi*. **Dpea** : *Doryteuthis pealeii*. **SoRef** : *Sepia officinalis*. **Lvlul** : *Loligo vulgaris*. **Ovul** : *Octopus vulgaris*.

Face à une telle diversité de formes très similaires (donc très probablement homologues), on peut d'ores et déjà imaginer la complexité des événements génétiques qui ont eu lieu : duplications, insertions, délétions, translocations, entre autres. De plus, la diversité des origines de ces séquences (espèces, stades, organes) rendent l'interprétation encore plus complexe. Malgré cela, nous avons tenté de mener une approche phylogénétique sur ces séquences.

## Construction d'un arbre phylogénétique des réfectines

Après avoir réalisé l'alignement de l'ensemble des 27 séquences à ma disposition (celles de la littérature, ainsi que celles que j'ai caractérisé pendant mon travail de thèse, cf. **Annexe A10**), une analyse phylogénétique par maximum de vraisemblance a été effectuée sur une portion de 172 acides aminés commune à toutes les séquences protéiques. L'arbre phylogénétique le plus parcimonieux a été obtenu en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance RAxML basé sur le modèle JTT (Jones-Taylor-Thornton) comme matrice de substitution et effectuée dans CIPRES Science Gateway (Miller *et al.*, 2010)

L'analyse phylogénétique montre un regroupement des séquences de réfectines en cinq groupes distincts que nous appellerons arbitrairement A, B, C, D, E (**Fig. 75**). Les séquences de *Doryteuthis pealei* sont regroupées dans le même ensemble (A). Toutes les séquences d'*Euprymna scolopes* sont dans le même groupe (D). Les séquences de *Loligo vulgaris*, *Loligo forbesi* et d'*Octopus vulgaris* se distribuent entre deux groupes : le B et le E. Les séquences de *Sepia officinalis* sont distribuées dans trois groupes différents : le groupe C constitué uniquement de séquences de *Sepia* (avec *SoRef1*, *2*, *3* et *4*), le groupe A avec la séquence *SoRef5* proche des séquences de *Doryteuthis pealei* et le groupe E avec la séquence *SoRef6*.



**Figure 75. Arbre phylogénétique des réfectines** construit sur la base des séquences d'acides aminés des réfectines en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance avec 1000 répliques de bootstrap. Le nombre représenté à chaque nœud de branchement indique la valeur de bootstrap (%); seules les valeurs et les ramifications supérieures à 50% sont indiquées.

Il est très probable que d'autres séquences existent chez des espèces comme *Doryteuthis pealei* et *Loligo forbesi*, et un travail plus approfondi et plus systématique permettrait d'enrichir cette construction phylogénétique. Un autre problème s'est posé à nous : l'absence de groupe externe pour enraciner l'arbre. Une recherche par BLAST des motifs répétés caractéristiques des réflectines a été effectuée sur les génomes et banque d'EST disponibles chez d'autres espèces de mollusques - chez deux gastéropodes (*Aplysia californica* et *Lottia gigantea*) et chez un bivalve (*Crassostrea gigas*) - mais sans aucun résultat. Je me suis également intéressée au nautilé, le seul céphalopode possédant une coquille externe, sans iridescence visible, et dont la position basale au sein de l'arbre phylogénétique des céphalopodes peut être informative. L'absence de toute forme de réflectine chez le nautilé signifierait en effet que les réflectines sont des protéines propres aux coléoides, c'est-à-dire étant « apparues » au moment de la perte de la coquille dans cette lignée. J'ai recherché, dans des extraits génomiques de Nautilé, la présence de gènes de la réflectine, à l'aide de couples d'amorces ayant fonctionnés chez *Sepia*, *Loligo* et *Octopus*. Après clonage et séquençage des produits de PCR, j'ai obtenu plusieurs séquences partielles de 400pb qui présentaient les mêmes motifs que les séquences de réflectine. Après les avoir alignées avec les autres séquences et avoir procédé à une analyse phylogénétique par maximum de vraisemblance, il s'est avéré que ces séquences étaient très proches des séquences de *Sepia*. Le très fort pourcentage d'identité entre les séquences obtenues chez le Nautilé et celles caractérisées chez la seiche, nous ayant paru suspect, nous avons pensé à une possible contamination de nos échantillons ou de nos PCR. L'hypothèse d'une contamination a été confirmée par la suite grâce à une nouvelle extraction d'ADN et de nouvelles PCR effectuées dans un laboratoire ne travaillant pas sur les céphalopodes. Ces PCR n'ayant donné aucun résultat positif. Nous n'avons donc pas pu caractériser la présence de séquences de réflectine chez le Nautilé, soit elles sont présentes mais n'ont pas été amplifiées soit la réflectine est absente chez le Nautilé. Mais dans tout les cas, ce travail ne nous a pas permis de trouver des gènes extérieurs aux Coléoides permettant l'enracinement de l'arbre phylogénétique.

#### Quelle histoire évolutive pour les réflectines ?

L'histoire de ces protéines semble difficile à reconstituer. En effet, la topologie de l'arbre ne permet pas de trancher facilement entre les deux scénarios les plus simples :

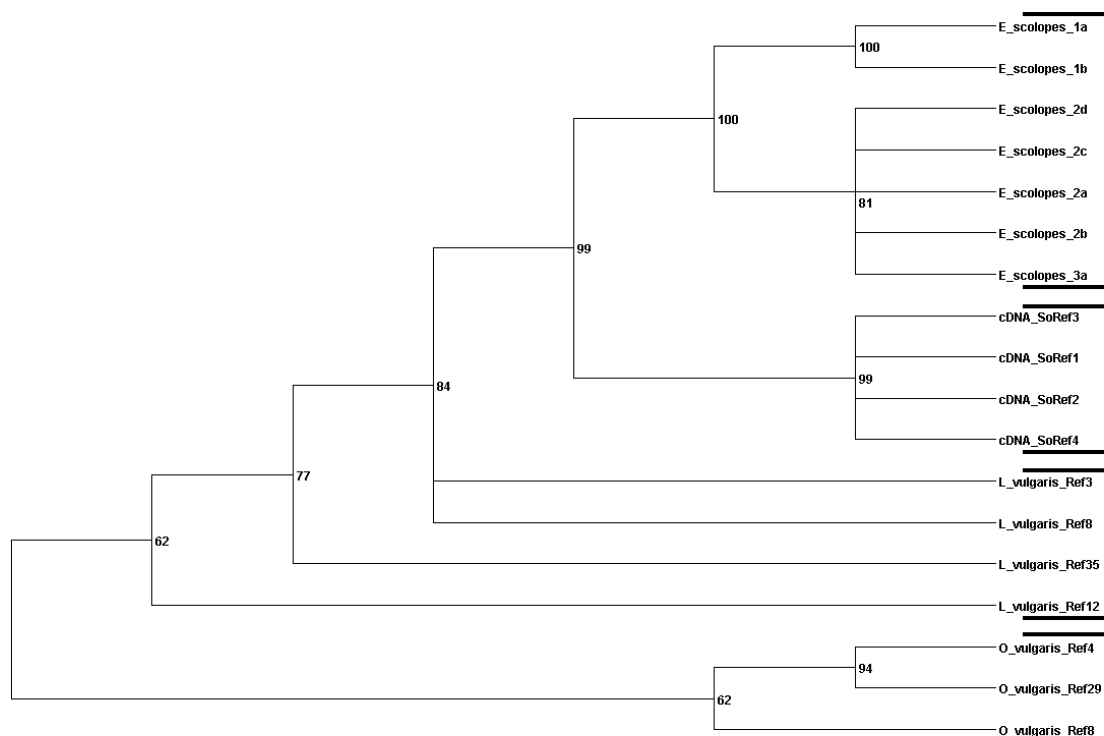
- 1) des groupes monophylétiques qui contiendraient toutes les séquences d'une même espèce, ce qui signifierait que la diversification des réflectines est propre à chaque grande lignée de céphalopodes ;
- 2) des groupes monophylétiques qui contiendraient des séquences de toutes les espèces, ce qui signifierait que la diversité des gènes de réflectines existait avant la radiation des grandes lignées de céphalopodes (à cause de pressions évolutives différentes).

Des pertes de certaines formes génétiques dans certaines lignées ou des convergences peuvent expliquer la complexité de l'arbre. Cependant, le faible nombre de séquences de réflectine connues au



sein de la famille des céphalopodes biaise la topologie de l'arbre et limite sa capacité à refléter l'histoire évolutive de cette famille de gènes.

J'ai néanmoins cherché à savoir si l'arbre ainsi obtenu ne permettait pas de trancher entre ces deux scénarios évolutifs. Les groupes C et D contiennent des formes d'une seule et même espèce, ils pourraient donc illustrer un scénario de type 1. Mais on peut également considérer les groupes B, C et D comme formant un seul grand groupe résultant de la diversification d'une autre forme de réflectine ancestrale. En prenant les formes de ces trois groupes et en positionnant celles d'*Octopus* comme outgroup (les octopodiformes étant groupe frère des décapodiformes, Lindgren *et al.*, 2012), j'ai obtenu l'arbre phylogénétique de la **figure 76**. Cet arbre se rapproche de la phylogénie des Coléoïdes (**Fig. 19** ; Lindgren *et al.*, 2012). On remarquera que, concernant *S. officinalis*, cet arbre regroupe 4 des six gènes de réflectine (*SoRef1, 2, 3, 4*), formes qui pourraient donc être des paralogues issus d'une même forme ancestrale. Il est par ailleurs intéressant de constater que les six formes décrites chez *E. scolopes* se regroupent toutes au sein de cette famille.



**Figure 76. Arbre phylogénétique construit sur la base des séquences des réflectines des groupes B, C et D de l'analyse précédente (Fig. 75) en utilisant les séquences d'*Octopus* en tant que groupe externe. La méthode du maximum de vraisemblance avec 1000 répliques de bootstrap a été utilisée. Le nombre représenté à chaque nœud de branchement indique la valeur de bootstrap (%); seules les valeurs et les ramifications supérieures à 60% sont indiquées.**

Quant aux groupe A et groupe E, ils contiennent très peu de séquences ce qui les rend difficiles à interpréter. Ils représentent peut-être la diversification de deux autres formes de réflectines ancestrales. Dans le groupe A, cette diversification s'est peut être traduite par des pertes chez *Loligo* et *Octopus*. Chez *S. officinalis*, les gènes *SoRef5* et *SoRef6* seraient des représentants actuels de chacune de ces formes ancestrales.

Cette hypothèse des « trois formes ancestrales de réflectine putatives » que je propose ici doit bien sûr être approfondie et confirmée par la recherche plus systématique des différentes formes de réflectines chez davantage d'espèces de céphalopodes. Elle illustre néanmoins une première tentative d'explication de la diversité des gènes de réflectine.

# **DISCUSSION**

---

# PERSPECTIVES EVOLUTIVES et DISCUSSIONS

---

## Réflexions sur l'évolution des structures tégumentaires au sein des céphalopodes

Les trois structures tégumentaires que sont les chromatophores, les iridophores et les leucophores sont présentes dans toutes les grandes familles de Coléoides actuels et chez toutes les espèces à quelques exceptions près (les Loliginidés pélagiques chez qui les leucophores sont absents). Il est donc très vraisemblable de penser que chacune de ces structures étaient déjà présentes chez les premiers Coléoides et n'ont été perdues par la suite que dans de très rares cas, après la radiation de ce groupe en Octopodiformes et Décapodiformes. L'homologie de chacune de ces structures au sein des Coléoides semble donc être l'hypothèse la plus probable.

La perte de la coquille externe chez les premiers Coléoides a libéré une nouvelle étendue tégumentaire à la surface des organismes : la peau externe du manteau (ventrale et dorsale). On peut néanmoins se demander si ces structures n'étaient pas déjà présentes chez les tous premiers céphalopodes à coquille externe, en particulier au niveau des structures tégumentaires de la tête et des bras (céphalopodium) non recouvertes par la coquille.

- Une première approche pour étudier cette question est de s'intéresser aux Nautilus (à défaut de pouvoir étudier les fossiles de familles éteintes de céphalopodes à coquille externe, tels que les Ammonoïdes). Chez le Nautilus actuel, la coloration orangée au niveau céphalique est due à des chromatophores simples (structures non neuromusculaires) ne présentant pas la capacité d'être étirés (Hanlon & Messenger, 1996). De même, aucune trace d'iridescence tégumentaire n'est observable ce qui semble indiquer que les iridophores sont absents de cette famille. L'hypothèse d'une simplification secondaire et totale des structures tégumentaires dans cette famille peut être formulée. Néanmoins notre recherche infructueuse de gènes de réflectine chez le Nautilus (**résultats §2.5**) semble plutôt indiquer que les trois structures tégumentaires spécifiques des Coléoides sont bien des innovations propres aux Coléoides et non à l'ancêtre de tous les céphalopodes, commun aux Coléoides et Nautilus. Toutefois, il est possible que ces gènes aient été perdus chez le nautilus ou tellement dégénérés que nous n'avons pas pu les caractériser à l'aide des amorces que nous avons établies.
- Une deuxième approche possible est d'étudier et de comparer, chez un Coléoïde actuel, la dynamique de développement des structures tégumentaires entre les téguments du céphalopodium (tête+bras) et du manteau. Notre travail à ce sujet, chez *Sepia officinalis*, que ce soit sur le développement des chromatophores (**résultats §1.1**) ou que ce soit sur le développement des iridophores (**résultats §2.1 et 2.3**) n'a pas révélé de processus ou de dynamiques clairement différents entre la tête et le manteau. Il n'est donc pas réellement

possible de trancher entre nos deux hypothèses évolutives : soit des processus développementaux similaires à ceux de la peau de la tête ont été recrutés au niveau du manteau suite à la perte de la coquille, soit les structures tégumentaires constituent des innovations qui sont apparues et qui ont été sélectionnées suite à la perte de la coquille, chez les premiers Coléoides sans coquille.

### **Réflexions sur l'origine et l'évolution des chromatophores des céphalopodes**

Les chromatophores décrits chez les Coléoides sont des structures dynamiques pluricellulaires (cellule pigmentaire et cellules musculaires radiaires). Il s'agit donc bien de chromatophores au sens fonctionnel du terme, mais qu'en est-il d'une éventuelle homologie avec les chromatophores des autres groupes animaux ? Si la présence de cellules musculaires radiaires semble être une spécificité des Coléoides, la cellule pigmentaire, elle, est peut-être homologue d'autres chromatophores, au moins au sein des Mollusques. Il est important de noter, qu'en dehors des céphalopodes, seules de très rares et très anciennes études histologiques se sont intéressées aux cellules pigmentaires des téguments chez les pulmonés (Chia-Tung-Pan, 1985). Aucune de ces études ne permet néanmoins de réaliser des comparaisons pertinentes avec les chromatophores des céphalopodes. La nature des pigments n'y est pas connue et la présence ou non d'un sac cyto-élastique dans ces cellules n'est pas décrite. L'évolution des structures tégumentaires des céphalopodes reste donc un champ d'étude largement ouvert. Les travaux que nous avons effectués, tant en biochimie (**résultats §1.3**) qu'en histologie (**résultats §1.1**), permet d'en savoir plus sur les chromatophores des céphalopodes mais il manque encore cruellement de données chez les autres Mollusques pour pouvoir proposer des hypothèses et des scénarios évolutifs fiables.

Le scénario évolutif le plus simple et le moins spéculatif que l'on puisse proposer, en l'état actuel des connaissances, serait que les cellules pigmentaires des chromatophores des céphalopodes soient les homologues des chromatophores des mollusques. Dans un second temps, le développement de fibres musculaires à leur proximité et à leur contact, chez les Coléoides et non chez les Nautiloides, leur auraient permis d'acquiescer un fonctionnement dynamique contrôlé nerveusement. Il est intéressant de noter que le L-glutamate, qui est le neurotransmetteur des fibres radiaires chez les céphalopodes, est également le neurotransmetteur de nombreuses fibres musculaires motrices chez les Mollusques (Bone & Howarth, 1980).

### **Réflexions sur l'origine et l'évolution des iridophores des céphalopodes**

L'iridescence tégumentaire est présente chez certains mollusques, comme les Nudibranches ou certains bivalves, mais rares sont les études qui la décrivent. Comme nous l'avons vu en introduction, une iridescence peut être obtenue de multiples façons et par une grande diversité de matériaux chez les métazoaires. Il est intéressant de noter que la recherche que nous avons menée pour trouver des motifs proches aux domaines répétés des réflectines dans les bases génétiques des métazoaires n'a pas été fructueuse (**résultats §2.5**). Seuls quelques travaux menés chez le clam *Tridacna gigas* ont montré une richesse en protéines riches en acides aminés soufrés (comme c'est le cas des réflectines)

au sein des plaquettes iridescentes de leurs iridophores (Griffiths *et al.*, 1992). Il est donc possible que les céphalopodes ne soient pas les seuls mollusques à présenter une « iridescence protéique » et que la famille des réflectines soit une famille existant également en dehors des céphalopodes. Encore une fois, c'est le manque de données disponibles chez les autres mollusques qui constitue désormais l'obstacle majeur à l'établissement d'hypothèses et de scénarios évolutifs.

Au sein des Coléoides, plusieurs formes de réflectines existent, entre les espèces et au sein de chaque espèce, leur structure est très proche avec des domaines très conservés, il semble y avoir une homologie (orthologie et/ou paralogie) entre ces différentes formes. Afin de comprendre la diversité actuelle des réflectines, nous avons travaillé sur les aspects développementaux (**résultats §2.3**) de manière à tester une éventuelle diversité de fonction entre les différentes formes, cette diversité de fonction pouvant être associée au développement d'organes ou de tissus différents. Avec toutes les précautions qu'il nous a fallu prendre pour interpréter nos hybridations *in situ* réalisées avec des sondes très proches les unes des autres, il ne semble pas y avoir d'expression organe/tissu spécifique des réflectines chez *S. officinalis* (**résultats §2.4**). En dehors d'un phénomène de dérive qui reste toujours possible, la diversité pourrait également s'expliquer par des fonctions « intra-cellulaires » différentes (**résultats §2.4**).

Parce que la diversité des réflectines peut s'expliquer à la fois par l'évolution de formes nouvelles au sein des espèces (paralogie) et par la radiation des espèces elles-mêmes (orthologie), l'histoire évolutive des réflectines est très difficile à appréhender. A cela s'ajoute le caractère partiel du jeu de données dont nous disposons avant d'entamer ce travail et qui reste encore incomplet malgré les efforts que j'ai pu mener dans ce sens (**résultats §2.5**). Enfin, la présence de domaines extrêmement conservés rend les analyses phylogénétiques particulièrement difficiles. Ainsi, il est encore impossible de discriminer au sein des diversités intra-spécifiques que l'on observe ce qui est hérité d'une diversité ancestrale et ce qui est le résultat d'une diversification propre à chaque taxon. Par exemple, les six gènes que nous avons trouvés chez *S. officinalis* (**résultats §2.2**) présentent à la fois des similarités très fortes entre eux (hypothèse d'une diversification tardive) et des similarités très fortes avec des formes d'autres espèces (hypothèse d'une diversité ancestrale). A l'heure actuelle, l'analyse que nous avons menée nous amène à envisager l'existence putative de trois formes ancestrales mais nous savons que l'ajout de nouvelles données pourrait facilement changer la topologie de nos arbres phylogénétiques. Un réel travail de recherche et de séquençage (tant en ARNm qu'en génomique) de toutes les formes existantes chez les espèces parmi lesquelles nous possédons déjà quelques données (*Euprymna scolopes*, *Loligo forbesi*, *Doryteuthis pealei*) et sur un spectre d'espèces judicieusement choisies pour représenter l'ensemble des groupes de céphalopodes.

### **Réflexions sur la corrélation étroite entre ornementation et mode/milieu de vie chez les céphalopodes**

Si les trois structures colorées tégumentaires sont présentes chez (quasiment) toutes les espèces de céphalopodes, les ornementations dont disposent les organismes sont relativement variées. Cette diversité présente une corrélation étroite avec le mode/milieu de vie/stade des

organismes selon qu'ils sont benthiques, pélagiques, juvéniles ou adultes. Que l'environnement exerce une pression de sélection forte sur l'ornementation d'un organisme et sélectionne les ornements les mieux adaptés est chose facile à interpréter. Par contre, la genèse d'ornements efficaces et adaptés au mode de vie pose la question des processus de développement impliqués et de leur variabilité.

Le développement des chromatophores et des iridophores que nous avons suivi chez *S. officinalis* (**résultats §1.1 et 2.1**) suit une dynamique apparemment très uniforme entre les individus. Bien que notre travail n'ait pas étudié précisément la variabilité des ornements et des dispositions relatives de chaque structure, nous n'avons jamais observé de variants notables. Au contraire, des mécanismes très précis interviennent dans la peau en développement pour ordonner la mise en place des structures. Le travail descriptif que nous avons mené permet désormais d'avoir une vision claire des différents arrangements de structures au sein de la peau en développement : cellules dispersées, lignes, amas cellulaires (**résultats §2.3**). À défaut d'avoir réussi à en trouver les mécanismes moléculaires (**résultats §1.2**), nous avons ainsi pu démontrer l'existence de mécanismes de type « répulsion » lors de la mise en place des chromatophores (**résultats §1.2**).

Une première difficulté face à laquelle nous nous trouvons actuellement est l'obtention de marqueurs moléculaires et/ou génétiques qui permettent de suivre les cellules progénitrices des chromatophores, des iridophores et des leucophores. Pour les iridophores, l'observation de l'expression des réflectines a rendu possible ce suivi (**résultats §2.3**) mais les cellules ainsi marquées sont des cellules en fin de différenciation. Nous n'avons pas encore les moyens de détecter les cellules progénitrices des iridophores au sein du tégument en développement. Pour les chromatophores et les leucophores, la difficulté est encore plus grande dans la mesure où ne disposons d'aucun marqueur (même de différenciation terminale) qui permette un suivi équivalent (**résultats §1.4**).

Une deuxième difficulté réside dans notre impossibilité à suivre individuellement les structures colorées d'un même organisme au cours du développement. En effet toute sortie de l'embryon de sa capsule perturbe son développement et diminue ses chances de survie. Seule une telle approche permettrait pourtant de tirer de véritables conclusions quant aux dynamiques de distributions et de réaliser des tests fonctionnels qui permettraient d'en perturber les paramètres (applications d'inhibiteurs par exemple).

L'observation faite de la mise en place des chromatophores et des iridophores n'a pas mis en évidence une association flagrante entre les deux structures, c'est-à-dire que la mise en place de l'un des types cellulaires ne semble pas être influencé par la mise en place de l'autre. Comme cela a pu être mis en évidence chez *Dario rerio* ou dans ce cas les types cellulaires impliqués se trouvent sur le même niveau (Frohnhofer *et al.*, 2013). Chez *Sepia officinalis*, l'espace d'un type cellulaire n'est pas limité par un autre type cellulaire au sein de la même couche.

Le travail que j'ai mené tout au long de cette thèse a été animé par le souci d'une approche globale du système de coloration de la peau. Ces structures ont été sélectionnées sous forme d'un ensemble fonctionnellement cohérent et il apparaissait judicieux de l'aborder dans ses différents

éléments pour tenter de saisir son histoire évolutive. Par ce travail pluridisciplinaire, nous avons tenté d'ouvrir plusieurs pistes. Certaines sont en cours (caractérisation des pigments), d'autres n'ont pas pu aboutir et nécessitent que l'on poursuive les investigations (hypothèse de Notch-Delta, de la tyrosinase), d'autres encore nous ont apporté des réponses importantes sur le développement de *S. officinalis* (réflectines) et permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives sur l'évolution des motifs colorés et de leurs structures chez les céphalopodes. La poursuite de ce travail (séquençage des réflectines, recherche des pigments, recherche de marqueurs) nous permettra à l'avenir d'en savoir plus sur les céphalopodes mais un effort devra également être fait pour aller collecter, au sein des Mollusques non-céphalopodes, les données qui nous permettront d'inférer des hypothèses évolutives.



# **BIBLIOGRAPHIE**

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Adamo, S. A., Ehgoetz, K., Sangster, C., & Whitehorne, I. (2006). Signaling to the enemy? body pattern expression and its response to external cues during hunting in the cuttlefish *sepia officinalis* (cephalopoda). *Biol Bull*, 210(3):192–200.
- Allen, J. J., Bell, G. R., Kuzirian, A. M., & Hanlon, R. T. (2013). Cuttlefish skin papilla morphology suggests a muscular hydrostatic function for rapid changeability. *Journal of Morphology*.
- Allen, J. J., Mähger, L. M., Barbosa, A., & Hanlon, R. T. (2009). Cuttlefish use visual cues to control three-dimensional skin papillae for camouflage. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 195(6):547–555.
- Andersen, S. O. (2010). Insect cuticular sclerotization: a review. *Insect biochemistry and molecular biology*, 40(3):166–178.
- Andersson, M. B. (1994). *Sexual selection*. Princeton University Press.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., & Fortini, M. E. (1995). Notch signaling. *Science*, 268(5208):225–232.
- Asai, R., Taguchi, E., Kume, Y., Saito, M., & Kondo, S. (1999). Zebrafish leopard gene as a component of the putative reaction-diffusion system. *Mechanisms of development*, 89(1):87–92.
- Aspengren, S., Hedberg, D., Sköld, H. N., & Wallin, M. (2009). Chapter 6 new insights into melanosome transport in vertebrate pigment cells. volume 272 of *International Review of Cell and Molecular Biology*, pages 245 – 302. Academic Press.
- Bagnara, J. T., Taylor, J. D., & Hadley, M. E. (1968). The dermal chromatophore unit. *The Journal of cell biology*, 38(1):67–79.
- Bandaranayake, W. M. (2006). The nature and role of pigments of marine invertebrates. *Nat Prod Rep*, 23(2):223–255.
- Beldade, P. & Brakefield, P. M. (2002). The genetics and evo-devo of butterfly wing patterns. *Nature Reviews Genetics*, 3(6):442–452.
- Beldade, P.; Brakefield, P. M. & Long, A. D. (2002). Contribution of Distal-less to quantitative variation in butterfly eyespots. *Nature*, 415:315–318.
- Berthier, S. (2003). *Iridescences, les couleurs physiques des insectes*. Springer.
- Bertrand, P. (2010). *La spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique-Fondements*, volume 1. Collection Grenoble Sciences.
- Billingham, R. & Silvers, W. K. (1960). The melanocytes of mammals. *Quarterly Review of Biology*, pages 1–40.
- Blois, M., Zahlan, A., & Maling, J. (1964). Electron spin resonance studies on melanin. *Biophysical journal*, 4(6):471–490.
- Boal, J., Shashar, N., Grable, M., Vaughan, K., Loew, E., & Hanlon, R. (2004). Behavioral evidence for intraspecific signals with achromatic and polarized light by cuttlefish (mollusca: Cephalopoda). *Behaviour*, 141:837–861.

- Boettiger, A., Ermentrout, B., & Oster, G. (2009). The neural origins of shell structure and pattern in aquatic mollusks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(16):6837–6842.
- Bone, Q. & Howarth, J. (1980). The role of l-glutamate in neuromuscular transmission in some molluscs. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 60(03):619–626.
- Boycott, B. (1961). The functional organization of the brain of the cuttlefish *sepia officinalis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 153:503–534.
- Braissant, O. & Wahli, W. (1998). A simplified in situ hybridization protocol using non-radioactively labeled probes to detect abundant and rare mRNAs on tissue sections. *BIOCHEMICA*, 1:10–16.
- Brunetti, C. R., Selegue, J. E., Monteiro, A., French, V., Brakefield, P. M., & Carroll, S. B. (2001). The generation and diversification of butterfly eyespot color patterns. *Current Biology*, 11(20):1578–1585.
- Burton, D. & O'Driscoll, M. (1992). "facilitation" of melanophore responses in winter flounder *pseudopleuronectes americanus*. *Journal of experimental biology*, 168(1):289–299.
- Campello, S., Beltramini, M., Giordano, G., Di Muro, P., Marino, S., & Bubacco, L. (2008). Role of the tertiary structure in the diphenol oxidase activity of octopus vulgaris hemocyanin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 471(2):159–167.
- Carlini, D. B., Reece, K. S., & Graves, J. E. (2000). Actin gene family evolution and the phylogeny of coleoid cephalopods (mollusca: Cephalopoda). *Molecular Biology and Evolution*, 17(9):1353–1370.
- Caro, T. (2013). The colours of extant mammals. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Elsevier.
- Carroll, S. B., Gates, J., Keys, D. N., Paddock, S. W., Panganiban, G., Selegue, J. E., & Williams, J. A. (1994). Pattern formation and eyespot determination in butterfly wings. *Science*, 265(5168):109–114.
- Chessel, D. (1978). Description non paramétrique de la dispersion spatiale des individus d'une espèce. *Biométrie et écologie*, 1:45–135.
- Chia-Tung-Pan, C. (1958). The general biology and topographic anatomy of *australorbis glabratus*. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College*, 119(3):237–299.
- Chiao, C. C. & Hanlon, R. T. (2001). Cuttlefish camouflage: visual perception of size, contrast and number of white squares on artificial checkerboard substrata initiates disruptive coloration. *J Exp Biol*, 204(Pt 12):2119–2125.
- Chiou, T.-H., Mähgler, L. M., Hanlon, R. T., & Cronin, T. W. (2007). Spectral and spatial properties of polarized light reflections from the arms of squid (*Loligo pealeii*) and cuttlefish (*Sepia officinalis* L.), iridescence. *J Exp Biol*, 210(Pt 20):3624–3635.
- Cloney, R. A. & Brocco, S. L. (1983). Chromatophore organs, reflector cells, iridocytes and leucophores in cephalopods. *American Zoology*, 23:581–592.
- Cloney, R. A. & Florey, E. (1968). Ultrastructure of cephalopod chromatophore organs. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 89(2):250–280.
- Consortium scilab (2010). Scilab : la plate-forme libre et gratuite de calcul numérique. Consortium Scilab (Digiteo), Domaine de Voluceau, France.
- Cooper, K. M., Hanlon, R. T., & Budelmann, B. U. (1990). Physiological color change in squid iridophores. ii. ultrastructural mechanisms in *Lolliguncula brevis*, iridescence, camouflage. *Cell Tissue Res*, 259(1):15–24.

- Cornwell, C., Messenger, J., & Hanlon, R. (1997). Chromatophores and body patterning in the squid *alloteuthis subulata*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 77(04):1243–1246.
- Cott, H. B. (1940). Adaptive coloration in animals.
- Cox, R. (2010). Body size and sexual dimorphism. In: *Encyclopedia of Animal Behavior*, Michael D. Breed & J. Moore, ed., pages 220 – 225. Academic Press.
- Cronin, T. W., Shashar, N., Caldwell, R. L., Marshall, J., Cheroske, A. G., & Chiou, T.-H. (2003). Polarization vision and its role in biological signaling. *Integr Comp Biol*, 43(4):549–558.
- Crookes, W. J., Ding, L.-L., Huang, Q. L., Kimbell, J. R., Horwitz, J., & McFall-Ngai, M. J. (2004). Reflectins: the unusual proteins of squid reflective tissues., iridescence. *Science*, 303(5655):235–238.
- Darwin, c. (1859). The origin of species. *The Modern Library, published by Random House, Inc., New York. First Edition was published on November, 24:1859.*
- Davies, N. B., Krebs, J. R., & West, S. A. (2012). *An introduction to behavioural ecology*, (4th ed.). John Wiley & Sons. (1st edition in 1981).
- Deacon, S. W., Serpinskaya, A. S., Vaughan, P. S., Fanarraga, M. L., Vernos, I., Vaughan, K. T., & Gelfand, V. I. (2003). Dynactin is required for bidirectional organelle transport. *The Journal of cell biology*, 160(3):297–301.
- DeMartini, D. G., Krogstad, D. V., & Morse, D. E. (2013). Membrane invaginations facilitate reversible water flux driving tunable iridescence in a dynamic biophotonic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(7):2552–2556.
- Denton, E. J. & Land, M. F. (1971). Mechanism of reflexion in silvery layers of fish and Cephalopods, iridescence. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 178(50):43–61.
- DiMarco, F. P. & Hanlon, R. T. (1997). Agonistic behavior in the squid *Ioligo plei* (Ioliginidae, teuthoidea): fighting tactics and the effects of size and resource value. *Ethology*, 103(2):89–108.
- Djediati, C. & Boukroufa, F. (1990). Reproduction comparée de *Mytilus galloprovincialis* et de *Perna perna* (L) sur la côte algéroise. *Haloties*, 10:115–127.
- Dubas, F. & Boyle, P. R. (1985). Chromatophore motor units in *Eledone cirrhosa* (Cephalopoda : Octopoda). *J Exp Biol*, 117:415–431.
- Dubas, F., Leonard, R. B., & Hanlon, R. T. (1986). Chromatophore motoneurons in the brain of the squid, *Lolliguncula brevis*: an HRP study. *Brain Res*, 374(1):21–29. Dubas, F Leonard, R B Hanlon, R T 2P40 RR 01024/RR/NCRR NIH HHS/United States Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Netherlands Brain research Brain Res. 1986 May 21;374(1):21-9.
- Dubas, F. (1987). Innervation of chromatophore muscle fibres in the octopus *Eledone cirrhosa*. *Cell Tissue Res*, 248(3):675–682.
- Eberhard, W. (1996). *Female control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton University Press.
- Egri, Á., Blahó, M., Kriska, G., Farkas, R., Gyurkovszky, M., Åkesson, S., & Horváth, G. (2012). Polarotactic tabanids find striped patterns with brightness and/or polarization modulation least attractive: an advantage of zebra stripes. *The Journal of Experimental Biology*, 215(5):736–745.

- Eiberg, H., Mohr, J., et al. (1996). Assignment of genes coding for brown eye colour (BEY2) and brown hair colour (HCL3) on chromosome 15q. *European journal of human genetics: EJHG*, 4(4):237–241.
- Fan, T., Li, M., Wang, J., Yang, L., & Cong, R. (2009). Purification and characterization of phenoloxidase from *Octopus ocellatus*. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 41(10):865–872.
- Ferguson, G., Messenger, J., & Budelmann, B. (1994). Gravity and light influence the countershading reflexes of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Journal of experimental biology*, 191(1):247–256.
- Ferguson, G. P., Martini, F. M., & Pinsker, H. M. (1988). Chromatophore motor fields in the squid, *Lolliguncula brevis*. *J Exp Biol*, 134:281–295.
- Ferguson, G. P. & Messenger, J. B. (1991). A countershading reflex in cephalopods. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 243(1306):63–67.
- Fiore, G., Poli, A., Di Cosmo, A., d'Ischia, M., & Palumbo, A. (2004). Dopamine in the ink defence system of *Sepia officinalis*: biosynthesis, vesicular compartmentation in mature ink gland cells, nitric oxide (NO)/cGMP-induced depletion and fate in secreted ink. *Biochemical Journal*, 378(Pt 3):785.
- Florey, E., Dubas, F., & Hanlon, R. T. (1985). Evidence for L-glutamate as a transmitter substance of motoneurons innervating squid chromatophore muscles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 82(2):259–268.
- Florey, E. & Kriebel, M. E. (1969). Electrical and mechanical responses of chromatophore muscle fibers of the squid, *Loligo opalescens*, to nerve stimulation and drugs. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 65(1):98–130.
- Forbes, P. (2009). *Dazzled and deceived: mimicry and camouflage*. Yale University Press.
- Fox, D. L. (1976). *Animal biochromes and structural colours: physical, chemical, distributional & physiological features of coloured bodies in the animal world*. University of California Pr. 2nd edition.
- Fox, D. L. & Crane, S. C. (1942). Concerning the pigments of the two-spotted octopus and the opalescent squid. *The Biological Bulletin*, 82(2):284–291.
- Froesch, D. (1973). Projection of chromatophore nerves on the body surface of *Octopus vulgaris*. *Marine Biology*, 19(2):153–155.
- Froesch, D. & Messenger, J. B. (1978). On leucophores and the chromatic unit of *Octopus vulgaris*. *Journal of Zoology*, 186(2):163–173.
- Frohnhöfer, H. G.; Krauss, J.; Maischein, H.-M. & Nüsslein-Volhard, C. (2013). Iridophores and their interactions with other chromatophores are required for stripe formation in zebrafish. *Development*, 140(14):2997–3007.
- Fuglei, E., Aanestad, M., & Berg, J. (2000). Hormones and metabolites of arctic foxes (*Alopex lagopus*) in response to season, starvation and re-feeding. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 126(2):287–294.
- Fujii, R. (2000). The regulation of motile activity in fish chromatophores. *Pigment Cell Research*, 13(5):300–319.
- Fukuzawa, T. & Bagnara, J. T. (1989). Control of Melanoblast Differentiation in Amphibia by  $\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone, a Serum Melanization Factor, and a Melanization Inhibiting Factor. *Pigment Cell Research*, 2(3):171–181.

- Gaston, M. R. & Tublitz, N. J. (2006). Central distribution and three-dimensional arrangement of fin chromatophore motoneurons in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Invert Neurosci*, 6(2):81–93.
- Gibert, J.-M., Peronnet, F., & Schlötterer, C. (2007). Phenotypic plasticity in drosophila pigmentation caused by temperature sensitivity of a chromatin regulator network. *PLoS genetics*, 3(2):e30.
- Goda, M., Ohata, M., Ikoma, H., Fujiyoshi, Y., Sugimoto, M., & Fujii, R. (2011). Integumental reddish-violet coloration owing to novel dichromatic chromatophores in the teleost fish, *Pseudochromis diadema*. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 24(4):614–617.
- Godechal, Q. & Gallez, B. (2011). The contribution of electron paramagnetic resonance to melanoma research. *Journal of skin cancer*, 2011.
- Gowland, F. C., Boyle, P. R., & Gowland, B. T. (2002). Pattern development in hatchling *Loligo forbesi* and its potential for quantification of chromatophore arrangement. *Bulletin of marine science*, 71(2):1067–1071.
- Griffiths, D. J. & Winsor, H. and Luong-van, T. (1992). Iridophores in the mantle of giant clams, iridescence. *Aust J Zool*, 40(3):319–326.
- Han, Q., Beerntsen, B. T., & Li, J. (2007). The tryptophan oxidation pathway in mosquitoes with emphasis on xanthurenic acid biosynthesis. *Journal of insect physiology*, 53(3):254–263.
- Hanlon, R. T. (1982). The functional organization of chromatophores and iridescent cells in the body patterning of *Loligo plei* (Cephalopoda: Myopsida). *Malacologia*, 23(1):89–119.
- Hanlon, R. T., Conroy, L.-A., & Forsythe, J. W. (2008). Mimicry and foraging behaviour of two tropical sand-flat octopus species off North Sulawesi, Indonesia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 93(1):23–38.
- Hanlon, R. T., Cooper, K. M., Budelmann, B. U., & Pappas, T. C. (1990). Physiological color change in squid iridophores. i. behavior, morphology and pharmacology in *Lolliguncula brevis*, iridescence. *Cell Tissue Res*, 259(1):3–14.
- Hanlon, R. T., Forsythe, J. W., & Joneschild, D. E. (1999). Crypsis, conspicuousness, mimicry and polyphenism as antipredator defences of foraging octopuses on Indo-Pacific coral reefs, with a method of quantifying crypsis from video tapes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 66(1):1–22.
- Hanlon, R. T. & Messenger, J. B. (1988). Adaptive coloration in young cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) : the morphology and development of body patterns and their relation to behaviour, camouflage. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, B 320:437–487.
- Hanlon, R. T. & Messenger, J. B. (1996). *Cephalopod behaviour*. Cambridge University Press.
- Herring, P. (2002). *The biology of the deep ocean*. Oxford University Press.
- Hofreiter, M. & Schöneberg, T. (2010). The genetic and evolutionary basis of colour variation in vertebrates. *Cellular and molecular life science*, 67(15):2591–2603.
- Houde, A. E. & Endler, J. A. (1990). Correlated evolution of female mating preferences and male color patterns in the guppy *Poecilia reticulata*. *Science*, 248(4961):1405–1408.
- Huheey, J. E. (1976). Studies in Warning Coloration and Mimicry. vii. Evolutionary Consequences of a Batesian-Müllerian spectrum: A Model for Müllerian Mimicry. *Evolution*, pages 86–93.
- Ingram, A. & Parker, A. (2008). A review of the diversity and evolution of photonic structures in butterflies, incorporating the work of John Huxley (the Natural History Museum, London from 1961 to 1990). *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1502):2465–2480.

- Istenic, L. & Ziegler, I. (1974). Riboflavin as "pigment" in the skin of *Proteus anguinus* L. *Naturwissenschaften*, 61(12):686–687.
- Izumi, M., Sweeney, A. M., Demartini, D., Weaver, J. C., Powers, M. L., Tao, A., Silvas, T. V., Kramer, R. M., Crookes-Goodson, W. J., Mäthger, L. M., Naik, R. R., Hanlon, R. T., & Morse, D. E. (2010). Changes in reflectin protein phosphorylation are associated with dynamic iridescence in squid. *J R Soc Interface*, 7(44):549–560.
- Johnsen, S. (2001). Hidden in plain sight: the ecology and physiology of organismal transparency. *The Biological Bulletin*, 201(3):301–318.
- Johnsen, S. (2013). Hide and seek in the open sea: Pelagic camouflage and visual countermeasures. *Annual Review of Marine Science*, 6(1).
- Johnson, S. L., Africa, D., Walker, C., & Weston, J. A. (1995). Genetic control of adult pigment stripe development in zebrafish. *Developmental biology*, 167(1):27–33.
- Jones, B. & Nishiguchi, M. (2004). Counterillumination in the hawaiian bobtail squid, *euprymna scolopes berry* (Mollusca: Cephalopoda). *Marine Biology*, 144(6):1151–1155.
- Kelsh, R. N. (2004). Genetics and evolution of pigment patterns in fish. *Pigment cell research*, 17(4):326–336.
- Kettlewell, H. (1961). The phenomenon of industrial melanism in lepidoptera. *Annual review of entomology*, 6(1):245–262.
- Kinoshita, S., Yoshioka, S., & Miyazaki, J. (2008). Physics of structural colors. *Reports on Progress in Physics*, 71(7):076401.
- Klungland, H. & Våge, D. (2003). Pigmentary switches in domestic animal species. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 994(1):331–338.
- Krajewski, J., Bonaldo, R., Sazima, C., & Sazima, I. (2009). Octopus mimicking its follower reef fish. *Journal of Natural History*, 43(3-4):185–190.
- Kramer, R. M., Crookes-Goodson, W. J., & Naik, R. R. (2007). The self-organizing properties of squid reflectin protein, iridescence. *Nat Mater*, 6(7):533–538.
- Kronforst, M. R., Barsh, G. S., Kopp, A., Mallet, J., Monteiro, A., Mullen, S. P., Protas, M., Rosenblum, E. B., Schneider, C. J., & Hoekstra, H. E. (2012). Unraveling the thread of nature's tapestry: the genetics of diversity and convergence in animal pigmentation. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 25(4):411–433.
- Lacoue-Labarthe, T., Bustamante, P., Hörlin, E., Luna-Acosta, A., Bado-Nilles, A., & Thomas-Guyon, H. (2009). Phenoloxidase activation in the embryo of the common cuttlefish *Sepia officinalis* and responses to the Ag and Cu exposure. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(3):516–521.
- Lamoreux, M. L., Delmas, V., Larue, L., & Bennett, D. (2010). *The colors of mice: a model genetic network*. John Wiley & Sons.
- Land, M. F. (1972). The physics and biology of animal reflectors. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 24:75–106.
- Land, M. F. & Nilsson, D.-E. (2012). *Animal eyes*. Oxford University Press.
- Lemaire, J. (1970). Table de développement embryonnaire de *Sepia officinalis* L.(mollusque céphalopode). *Bull Soc Zool Fr*, 95:773–782.

- Li, C., Kim, K., & Nelson, L. S. (1999). FMRFamide-related neuropeptide gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Brain research*, 848(1):26–34.
- Lindgren, A., Pankey, M., Hochberg, F., & Oakley, T. (2012). A multi-gene phylogeny of Cephalopoda supports convergent morphological evolution in association with multiple habitat shifts in the marine environment. *BMC Evolutionary Biology*, 12(1):129.
- Lindgren, A. R., Giribet, G., & Nishiguchi, M. (2004). A combined approach to the phylogeny of Cephalopoda (Mollusca). *Cladistics*, 20(5):454–486.
- Linzen, B. (1967). Zur biochemie der ommochrome. *Naturwissenschaften*, 54(11):259–267.
- Loi, Saunders, Young, & Tublitz (1996). Peptidergic regulation of chromatophore function in the European cuttlefish *Sepia officinalis*. *J Exp Biol*, 199(Pt 5):1177–1187.
- Loi, P. & Tublitz, N. (1997). Molecular analysis of FMRFamide-and FMRFamide-related peptides (farpes) in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Journal of experimental biology*, 200(10):1483–1489.
- Loi, P. K. & Tublitz, N. J. (2000). Roles of glutamate and FMRFamide-related peptides at the chromatophore neuromuscular junction in the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *J Comp Neurol*, 420(4):499–511.
- López-Vera, E., Aguilar, M. B., & Heimer de la Coteria, E. P. (2008). FMRFamide and related peptides in the phylum mollusca. *Peptides*, 29(2):310–317.
- Maan, M. E. & Cummings, M. E. (2012). Poison frog colors are honest signals of toxicity, particularly for bird predators. *The American Naturalist*, 179(1):E1–E14.
- Maan, M. E. & Sefc, K. M. (2013). Colour variation in cichlid fish: developmental mechanisms, selective pressures and evolutionary consequences. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Elsevier.
- Marshall, J. & Johnsen, S. (2011). *Animal camouflage: mechanisms and function*, chapter 11 Camouflage in marine fish, pages 186–211. Cambridge University Press.
- Marshall, N. & Messenger, J. (1996). Colour-blind camouflage. *Nature*, 382:408–409.
- Mäthger, L. M., Barbosa, A., Miner, S., & Hanlon, R. T. (2006). Color blindness and contrast perception in cuttlefish (*Sepia officinalis*) determined by a visual sensorimotor assay, camouflage. *Vision Res*, 46(11):1746–1753.
- Mäthger, L. M., Collins, T. F. T., & Lima, P. A. (2004). The role of muscarinic receptors and intracellular Ca<sup>2+</sup> in the spectral reflectivity changes of squid iridophores., iridescence. *J Exp Biol*, 207(Pt 11):1759–1769.
- Mäthger, L. M. & Denton, E. J. (2001). Reflective properties of iridophores and fluorescent 'eyespot' in the loliginid squid *Alloteuthis subulata* and *Loligo vulgaris*., iridescence. *J Exp Biol*, 204(Pt 12):2103–2118.
- Mäthger, L. M., Denton, E. J., Marshall, N. J., & Hanlon, R. T. (2009a). Mechanisms and behavioural functions of structural coloration in Cephalopods., iridescence. *J R Soc Interface*, 6 Suppl 2:S149–S163.
- Mäthger, L. M. & Hanlon, R. T. (2006). Anatomical basis for camouflaged polarized light communication in squid., iridescence. *Biol Lett*, 2(4):494–496.
- Mäthger, L. M. & Hanlon, R. T. (2007). Malleable skin coloration in cephalopods: selective reflectance, transmission and absorbance of light by chromatophores and iridophores., iridescence. *Cell Tissue Res*, 329(1):179–186.



- Mäthger, L. M., Shashar, N., & Hanlon, R. T. (2009b). Do Cephalopods communicate using polarized light reflections from their skin?, iridescence. *J Exp Biol*, 212(Pt 14):2133–2140.
- Matsuura, T., Hino, M., Akutagawa, S.-i., Shimoyama, Y., Kobayashi, T., Taya, Y., & Ueno, T. (2009). Optical and paramagnetic properties of size-controlled ink particles isolated from *Sepia officinalis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73(12):2790–2792.
- Mattiello, T., d'Ischia, M., & Palumbo, A. (2013). Nitric oxide in chromatic body patterning elements of *Sepia officinalis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.
- Mattiello, T., Fiore, G., Brown, E. R., d'Ischia, M., & Palumbo, A. (2010). Nitric oxide mediates the glutamate-dependent pathway for neurotransmission in *Sepia officinalis* chromatophore organs. *Journal of Biological Chemistry*, 285(31):24154–24163.
- Mautz, B. S., Møller, A. P., & Jennions, M. D. (2013). Do male secondary sexual characters signal ejaculate quality? a meta-analysis. *Biological Reviews*.
- Mazel, C., Cronin, T., Caldwell, R., & Marshall, N. (2004). Fluorescent enhancement of signaling in a mantis shrimp. *Science*, 303(5654):51–51.
- McConathy, D. A., Hanlon, R. T., & Hixon, R. F. (1980). Chromatophores arrangements of hatchling loligid squid (cephalopoda, myopsida). *Malacologia*, 19:279–288.
- McFall-Ngai, M. J. (1990). Cypsis in the pelagic environment. *American Zoologist*, 30(1):175–188.
- Meinhardt, H. & Gierer, A. (1974). Applications of a theory of biological pattern formation based on lateral inhibition. *Journal of cell science*, 15(2):321–346.
- Messenger, Cornwell, & Reed (1997). L-glutamate and serotonin are endogenous in squid chromatophore nerves. *J Exp Biol*, 200 (Pt 23):3043–3054.
- Messenger, J. (1968). The visual attack of the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Animal Behaviour*, 16(2):342–357.
- Messenger, J. (1974). Reflecting elements in cephalopod skin and their importance for camouflage. *Journal of Zoology*, 174(3):387–395.
- Messenger, J. (1979). The eyes and skin of octopus: compensating for sensory deficiencies. *Endeavour*, 3(3):92–98.
- Messenger, J. B. (2001). Cephalopod chromatophores: neurobiology and natural history. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 76(4):473–528.
- Michiels, N., Anthes, N., Hart, N., Herler, J., Meixner, A., Schleifenbaum, F., Schulte, G., Siebeck, U., Sprenger, D., & Wucherer, M. (2008). Red fluorescence in reef fish: A novel signalling mechanism? *BMC ecology*, 8(1):16.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the cypress science gateway for inference of large phylogenetic trees. In: *Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 2010*, pages 1–8. IEEE.
- Mills, M. G. & Patterson, L. B. (2009). Not just black and white: pigment pattern development and evolution in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol*, 20(1):72–81.
- Mirow, S. (1972a). Skin color in the squids *Loligo pealii* and *Loligo opalescens*. I. chromatophores. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 125(2):143–175.

- Mirow, S. (1972b). Skin color in the squids *Loligo pealii* and *Loligo opalescens*. II. iridophores, iridescence. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 125(2):176–190.
- Mobley, C. D. (1994). *Light and water: Radiative transfer in natural waters*, volume 592. Academic press San Diego.
- Moynihan, M. (1985). *Communication and noncommunication by cephalopods*. Indiana University Press Bloomington, IN.
- Naraoka, T., Uchisawa, H., Mori, H., Matsue, H., Chiba, S., & Kimura, A. (2003). Purification, characterization and molecular cloning of tyrosinase from the Cephalopod Mollusk, *Illex argentinus*. *European Journal of Biochemistry*, 270(19):4026–4038.
- Neudecker, S. (1989). Eye camouflage and false eyespots: chaetodontid responses to predators. *Environmental Biology of Fishes*, 25(1-3):143–157.
- Norman, M. D., Finn, J., & Tregenza, T. (2001). Dynamic mimicry in an indo-malayan octopus. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1478):1755–1758.
- Olson, V. A. & Owens, I. P. (1998). Costly sexual signals: are carotenoids rare, risky or required? *Trends in Ecology & Evolution*, 13(12):510–514.
- Olsson, M., Stuart-Fox, D., & Ballen, C. (2013). Genetics and evolution of colour patterns in reptiles. In: *Seminars in cell & developmental biology*, volume 24, pages 529–541. Elsevier.
- Oxford, G. & Gillespie, R. (1998). Evolution and ecology of spider coloration. *Annual review of entomology*, 43(1):619–643.
- Packard, A. (1982). Morphogenesis of chromatophore patterns in Cephalopods: are morphological and physiological 'units' the same. *Malacologia*, 23(1):193–201.
- Packard, A. (1985). Sizes and distribution of chromatophores during post-embryonic development in Cephalopods. *Vie et milieu*, 35(3-4):285–298.
- Packard, A. & Hochberg, F. (1977). *The Biology of Cephalopods, camouflage*, volume 38 of *Zoological society of London*, chapter Skin patterning in Octopus and other genera, pages 191–231. Academic Press.
- Packard, A. & Sanders, G. (1969). What the octopus shows to the world. *Endeavour*, 28(104):92.
- Packard, A. & Sanders, G. D. (1971). Body patterns of *Octopus vulgaris* and maturation of the response to disturbance. *Animal Behaviour*, 19(4):780–790.
- Palazzo, R. E., Lynch, T. J., Lo, S. J., Taylor, J. D., & Tchen, T. (1989). Rearrangements of pterinosomes and cytoskeleton accompanying pigment dispersion in goldfish xanthophores. *Cell motility and the cytoskeleton*, 13(1):9–20.
- Palumbo, A. (2005). Nitric oxide in marine invertebrates: a comparative perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 142(2):241–248.
- Palumbo, A. & d'Ischia, M. (2007). Nitric oxide biogenesis, signalling and roles in molluscs: The *Sepia officinalis* paradigm. *Advances in experimental biology*, 1:45–451.
- Palumbo, A., Poli, A., Di Cosmo, A., & d'Ischia, M. (2000). N-methyl-d-aspartate receptor stimulation activates tyrosinase and promotes melanin synthesis in the ink gland of the cuttlefish *Sepia officinalis* through the nitric oxide/cGMP signal transduction pathway a novel possible role for glutamate as physiologic activator of melanogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(22):16885–16890.

- Parichy, D. M. & Johnson, S. L. (2001). Zebrafish hybrids suggest genetic mechanisms for pigment pattern diversification in danio. *Development genes and evolution*, 211(7):319–328.
- Parker, A. R. (1998). The diversity and implications of animal structural colours., iridescence. *J Exp Biol*, 201(Pt 16):2343–2347.
- Parker, A. R. & Martini, N. (2006). Structural colour in animals-simple to complex optics. *Optics & Laser Technology*, 38(4):315–322.
- Passeron, T., Ballotti, R., & JP, O. (2005). Melanogenèse. *EMC-Dermatologie Cosmetologie*, 2:204–216.
- Phillips, J. P., Forrest, H. S., & Kulkarni, A. D. (1973). Terminal synthesis of xanthommatin in *Drosophila melanogaster*. III. mutational pleiotropy and pigment granule association of phenoxazinone synthetase. *Genetics*, 73(1):45–56.
- Porras, M. G., Loof, A. D., Breuer, M., & Aréchiga, H. (2003). Corazonin promotes tegumentary pigment migration in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Peptides*, 24(10):1581–1589.
- Prota, G., Ortonne, J. P., Voulot, C., Khatchadourian, C., Nardi, G., & Palumbo, A. (1981). Occurrence and properties of tyrosinase in the ejected ink of Cephalopods. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 68(3):415–419.
- Protas, M. E. & Patel, N. H. (2008). Evolution of coloration patterns. *Annual review of cell and developmental biology*, 24:425–446.
- Ramachandran, V., Tyler, C., Gregory, R., Rogers-Ramachandran, D., Duensing, S., Pillsbury, C., & Ramachandran, C. (1996). Rapid adaptive camouflage in tropical flounders. *Nature*, 379(6568):815–818.
- Randall, J. E. (2005). A review of mimicry in marine fishes. *ZOOLOGICAL STUDIES-TAIPEI*, 44(3):299.
- R Development Core Team (2010). R : A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Reed, C. M. (1995). The ultrastructure and innervation of muscles controlling chromatophore expansion in the squid, *Loligo vulgaris*. *Cell and tissue research*, 282(3):503–512.
- Ricklefs, R. E. (2010). *The economy of nature*, (6th ed.). W. H. Freeman and Company.
- Riou, M. & Christidès, J.-P. (2010). Cryptic color change in a crab spider (*Misumena vatia*): identification and quantification of precursors and ommochrome pigments by HPLC. *Journal of chemical ecology*, 36(4):412–423.
- Ritland, D. B. & Brower, L. P. (1991). The viceroy butterfly is not a Batesian Mimic.
- Roper, C. F. & Hochberg, F. (1988). Behavior and systematics of cephalopods from Lizard Island, Australia, based on color and body patterns. *Malacologia*. 1988.
- Roulin, A. (2004). The evolution, maintenance and adaptive function of genetic colour polymorphism in birds. *Biological Reviews*, 79(4):815–848.
- Roulin, A. & Ducrest, A.-L. (2013). Genetics of coloration in birds. In: *Seminars in cell & developmental biology*, volume 24, pages 594–608. Elsevier.

- Rowland, H. M. (2009). From abbot thayer to the present day: what have we learned about the function of countershading? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1516):519–527.
- Rudh, A. & Qvarnström, A. (2013). Adaptive coloration in amphibians. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Elsevier.
- Ruxton, G. D., Sherratt, T. N., & Speed, M. P. (2004). *Avoiding attack: the evolutionary ecology of crypsis, warning signals, and mimicry*, volume 249. Oxford University Press Oxford.
- Scheinker, V., Fiore, G., Di Cristo, C., Di Cosmo, A., di ½Ischia, M., Enikolopov, G., & Palumbo, A. (2005). Nitric oxide synthase in the nervous system and ink gland of the cuttlefish *Sepia officinalis*: Molecular cloning and expression. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(2):1204–1215.
- Schwinck, I. (1953). Über den nachweis eines redox-pigmentes (ommochrom) in der haut von sepia officinalis. *Naturwissenschaften*, 40(13):365–365.
- Seago, A. E., Brady, P., Vigneron, J.-P., & Schultz, T. D. (2009). Gold bugs and beyond: a review of iridescence and structural colour mechanisms in beetles (Coleoptera). *Journal of the Royal Society Interface*, 6(Suppl 2):S165–S184.
- Sealy, R. C., Hyde, J. S., Felix, C. C., Menon, I., Prota, G., Swartz, H. M., Persad, S., & Haberman, H. (1982). Novel free radicals in synthetic and natural pheomelanins: distinction between dopa melanins and cysteinyl-dopa melanins by ESR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(9):2885–2889.
- Searcy, W. & Nowicki, S. (2009). Sexual selection and the evolution of animal signals. In: *Encyclopedia of Neuroscience*, L. R. Squire, ed., pages 759 – 766. Academic Press.
- Shashar, Rutledge, & Cronin (1996). Polarization vision in cuttlefish in a concealed communication channel? *J Exp Biol*, 199(Pt 9):2077–2084.
- Shashar, N., Borst, D. T., Ament, S. A., Saidel, W. M., Smolowitz, R. M., & Hanlon, R. T. (2001). Polarization reflecting iridophores in the arms of the squid *Loligo pealeii*, iridescence. *Biol Bull*, 201(2):267–268.
- Shashar, N. & Cronin, T. W. (1996). Polarization contrast vision in octopus. *J Exp Biol*, 199(Pt 4):999–1004.
- Shashar, N. & Hanlon, R. T. (1997). Squids (*Loligo pealei* and *Euprymna scolopes*) can exhibit polarized light patterns produced by their skin. *Biol. Bull.*, 193:207–208.
- Siddiqui, N. I., Akosung, R. F., & Gielens, C. (2006). Location of intrinsic and inducible phenoloxidase activity in molluscan hemocyanin. *Biochemical and biophysical research communications*, 348(3):1138–1144.
- Siebeck, U. E. (2004). Communication in coral reef fish: the role of ultraviolet colour patterns in damselfish territorial behaviour. *Animal Behaviour*, 68(2):273–282.
- Siebeck, U. E., Parker, A. N., Sprenger, D., Mähger, L. M., & Wallis, G. (2010). A species of reef fish that uses ultraviolet patterns for covert face recognition. *Current Biology*, 20(5):407–410.
- Simpson, P. (1997). Notch signalling in development: on equivalence groups and asymmetric developmental potential. *Current opinion in genetics & development*, 7(4):537–542.
- Slominski, A., Wortsman, J., Plonka, P. M., Schallreuter, K. U., Paus, R., & Tobin, D. J. (2004). Hair follicle pigmentation. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(1):13–21.

- Stevens, M., Cuthill, I. C., Windsor, A. M., & Walker, H. J. (2006). Disruptive contrast in animal camouflage. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1600):2433–2438.
- Stevens, M. & Merilaita, S. (2009). Animal camouflage: current issues and new perspectives. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364(1516):423–427.
- Stevens, M. & Ruxton, G. D. (2012). Linking the evolution and form of warning coloration in nature. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1728):417–426.
- Stevens, M., Stubbins, C. L., & Hardman, C. J. (2008). The anti-predator function of 'eyespot' on camouflaged and conspicuous prey. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62(11):1787–1793.
- Strugnell, J. & Nishiguchi, M. K. (2007). Molecular phylogeny of Coleoid Cephalopods (Mollusca: Cephalopoda) inferred from three mitochondrial and six nuclear loci: a comparison of alignment, implied alignment and analysis methods. *Journal of Molluscan Studies*, 73(4):399–410.
- Sugumaran, M. (2002). Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Research*, 15(1):2–9.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). Mega5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 28(10):2731–2739.
- Tao, A. R., DeMartini, D. G., Izumi, M., Sweeney, A. M., Holt, A. L., & Morse, D. E. (2010). The role of protein assembly in dynamically tunable bio-optical tissues. *Biomaterials*, 31(5):793–801.
- Théry, M. & Casas, J. (2009). The multiple disguises of spiders: web colour and decorations, body colour and movement. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1516):471–480.
- Torii, K. U. (2012). Two-dimensional spatial patterning in developmental systems. *Trends in Cell Biology*, 22(8):438–446.
- Tublitz, N. J., Gaston, M. R., & Loi, P. K. (2006). Neural regulation of a complex behavior: body patterning in cephalopod molluscs. *Integrative and Comparative Biology*, 46(6):880–889.
- Våge, D. I., Fuglei, E., Snipstad, K., Beheim, J., Landsem, V. M., & Klungland, H. (2005). Two cysteine substitutions in the MC1R generate the blue variant of the arctic fox (*Alopex lagopus*) and prevent expression of the white winter coat. *Peptides*, 26(10):1814–1817.
- Valeur, B. (2011). *La couleur dans tous ses éclats*. Belin pour la science.
- Van den Branden, C. & Declair, W. (1976). A study of the chromatophore pigments in the skin of the Cephalopod *Sepia officinalis* L. *Biol. Jb. Dodonaea*, 44:345–352.
- Vazquez, S., Garner, B., Sheil, M. M., & Truscott, R. J. (2000). Characterisation of the major autoxidation products of 3-hydroxykynurenine under physiological conditions. *Free radical research*, 32(1):11–23.
- Vigneron, J. P., Rassart, M., Vandenberg, C., Lousse, V., Deparis, O., Biró, L. P., Dedouaire, D., Cornet, A., & Defrance, P. (2006). Spectral filtering of visible light by the cuticle of metallic woodboring beetles and microfabrication of a matching bioinspired material. *Physical Review E*, 73(4):041905.
- Villanueva, R. & Norman, M. D. (2008). Biology of the planktonic stages of benthic octopuses. *Oceanography and Marine Biology*, 46:105–202.

- Vukusic, P. & Sambles, J. R. (2003). Photonic structures in biology., iridescence. *Nature*, 424(6950):852–855.
- Wang, I. J. & Shaffer, H. B. (2008). Rapid color evolution in an aposematic species: A phylogenetic analysis of color variation in the strikingly polymorphic strawberry poison-dart frog. *Evolution*, 62(11):2742–2759.
- Wardill, T. J., Gonzalez-Bellido, P. T., Crook, R. J., & Hanlon, R. T. (2012). Neural control of tuneable skin iridescence in squid. *Proc Biol Sci*, 279(1745):4243–4252.
- Warrant, E. J. & Locket, N. A. (2004). Vision in the deep sea. *Biological Reviews*, 79(3):671–712.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9):1189–1191.
- Weiss, I. M. & Kirchner, H. O. (2010). The peacock's train (*Pavo cristatus* and *Pavo cristatus* mut. alba) I. structure, mechanics, and chemistry of the tail feather coverts. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 313(10):690–703.
- Weiss, J. L., Evans, N. A., Ahmed, T., Wrigley, J. D. J., Khan, S., Wright, C., Keen, J. N., Holzenburg, A., & Findlay, J. B. C. (2005). Methionine-rich repeat proteins: a family of membrane-associated proteins which contain unusual repeat regions., iridescence. *Biochim Biophys Acta*, 1668(2):164–174.
- Welch, V., Vigneron, J., & Parker, A. (2005). The cause of colouration in the Ctenophore *Beroë cucumis*. *Current Biology*, 15(24):R985–R986.
- Welte, M. A. (2004). Bidirectional transport along microtubules. *Current Biology*, 14(13):R525–R537.
- Whiting, M. J., Stuart-Fox, D. M., O'Connor, D., Firth, D., Bennett, N. C., & Blomberg, S. P. (2006). Ultraviolet signals ultra-aggression in a lizard. *Animal Behaviour*, 72(2):353–363.
- Widder, E. A. (2010). Bioluminescence in the ocean: origins of biological, chemical, and ecological diversity. *Science*, 328(5979):704–708.
- Wilson, T. & Hastings, J. W. (1998). Bioluminescence. *Annual review of cell and developmental biology*, 14(1):197–230.
- Yacob, J., Lewis, A. C., Gosling, A., Hilaire, D. H. J. S., Tesar, L., McRae, M., & Tublitz, N. J. (2011). Principles underlying chromatophore addition during maturation in the European cuttlefish, *Sepia officinalis*. *J Exp Biol*, 214(Pt 20):3423–3432.
- Young, R. E. & Harman, R. F. (1988). 'larva', 'paralarva' and 'subadult' in cephalopod terminology. *Malacologia*, 29:201–207.

# ARTICLES

Article n°1

Aroua, S., Andouche, A., Martin, M., Baratte, S. & Bonnaud, L. (2011). FaRP cell distribution in the developing CNS suggests the involvement of FaRPs in all parts of the chromatophore control pathway in *Sepia officinalis* (Cephalopoda). *Zoology*, 114(2):113-122





Contents lists available at ScienceDirect

Zoology

journal homepage: [www.elsevier.de/zool](http://www.elsevier.de/zool)

ZOOLOGY

## FaRP cell distribution in the developing CNS suggests the involvement of FaRPs in all parts of the chromatophore control pathway in *Sepia officinalis* (Cephalopoda)

Salima Aroua<sup>a,b,\*</sup>, Aude Andouche<sup>a</sup>, Madeleine Martin<sup>a</sup>, Sébastien Baratte<sup>a,c</sup>, Laure Bonnaud<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire «Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques», UMR MNHN/CNRS 7208/IRD 207/UPMC, Muséum National d'Histoire Naturelle, DMPA, 55 rue Buffon, CP51, F-75005 Paris, France

<sup>b</sup> University Paris Diderot – Paris 7, 7 rue Watt, F-75013 Paris, France

<sup>c</sup> University Paris Sorbonne – Paris 4, F-75005 Paris, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 June 2010

Received in revised form 30 July 2010

Accepted 8 November 2010

#### Keywords:

Body patterning

Cephalopods

Chromatophores

FMRamide-related peptides

Nervous system

### ABSTRACT

The FMRamide-related peptide (FaRP) family includes a wide range of neuropeptides that have a role in many biological functions. In cephalopods, these peptides intervene in the peculiar body patterning system used for communication and camouflage. This system is particularly well developed in the cuttlefish and is functional immediately after hatching (stage 30). In this study, we investigate when and how the neural structures involved in the control of body patterning emerge and combine during *Sepia* embryogenesis, by studying the expression or the production of FaRPs. We detected FaRP expression and production in the nervous system of embryos from the beginning of organogenesis (stage 16). The wider FaRP expression was observed concomitantly with brain differentiation (around stage 22). Until hatching, FaRP-positive cells were located in specific areas of the central and peripheral nervous system (CNS and PNS). Most of these areas were implicated in the control of body patterns, suggesting that FaRPs are involved in all parts of the neural body pattern control system, from the 'receptive areas' via the CNS to the chromatophore effectors.

© 2011 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### 1. Introduction

The tetrapeptide FMRamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>) was first identified in a bivalve mollusc, *Macrocallista nimbosa*, by Price and Greenberg (1977). Since this discovery a large number of peptides, called FMRamide-related peptides (FaRPs) and characterised by a C-terminal amino-acid sequence ending with Rfamamide, were identified in different phyla of metazoans: cnidarians, platyhelminths, annelids, molluscs, nematodes, arthropods, and vertebrates (review in Espinoza et al., 2000; Walker et al., 2009). In each phylum, several FaRP forms have been characterised, and in some cases, from several genes. In the nematode *Caenorhabditis elegans*, 22 genes were described that code for 59 distinct FaRPs (Li et al., 1999). In this species, FaRPs are implicated in a variety of physiological functions such as the control of movements, feeding, defecation and reproduction (Li et al., 1999). In insects, at least 3 different genes that code for FaRPs are known: FMRamide, myosuppressins and sulfakinins (Orchard et al., 2001). These are involved in muscle relaxation or contraction (Orchard et al., 2001; Nichols, 2003). In mammals, 5 genes that code for FaRPs

have been identified. Their precursors are expressed in the CNS and are involved in nociception, food intake and reproduction (Chartrel et al., 2006).

After the discovery of FMRamide in molluscs, several other FaRPs have been described (review in Lopez-Vera et al., 2008; Walker et al., 2009). FaRPs may be involved in many physiological functions, such as the modulation of sensory organs, reproduction, motility, osmoregulation, feeding and neurogenesis (Heyliger et al., 1998; Lopez-Vera et al., 2008). Moreover, different studies focused on FaRP distribution have indicated that these peptides are widely distributed in the adult CNS and PNS. The presence of FaRPs in ganglia of the bivalve *Placopecten magellanicus*, and in many gastropods, has been confirmed using immunohistochemistry (Too and Croll, 1995). Gastropods are the most widely studied group of molluscs. FaRP immunoreactivity has been demonstrated in the nerves and ganglia of many gastropod species, such as *Helix aspersa* (Cottrell et al., 1981), *Lymnaea stagnalis* (Schot and Boer, 1982), *Aplysia californica* (Schaefer et al., 1985), and *Helisoma duryi* (Khan et al., 1998). In cephalopods, FaRP immunostaining has also been demonstrated in the CNS of different species, such as *Sepia officinalis* (Le Gall et al., 1988), *Octopus vulgaris* (Di Cosmo and Di Cristo, 1998) and *Idiosepius notoides* (Wollesen et al., 2008). Studies investigating FaRPs' potential physiological roles have revealed their involvement in oocyte transport and nidamental gland secretion (Henry et al., 1999; Di Cristo et al., 2002), the control of the

\* Corresponding author at: Muséum National d'Histoire Naturelle, 55 rue Buffon, CP 51 75005 Paris, France.

E-mail address: [aroua@mnhn.fr](mailto:aroua@mnhn.fr) (S. Aroua).

neuroendocrine optic gland (Di Cosmo and Di Cristo, 1998; Di Cristo et al., 2003), and neuromodulation in the CNS (Cottrell et al., 1992; Chrachri and Williamson, 2003). In addition, several studies on *S. officinalis* have demonstrated the involvement of FaRPs in the control of colour patterning (Loi et al., 1996; Loi and Tublitz, 1997, 2000; Gaston and Tublitz, 2004; Tublitz et al., 2006).

Many studies investigating the organisation of the adult cephalopod nervous system have proposed a main pathway in the control of body patterns, which runs from the eye via the brain to the chromatophores (Young, 1971, 1974, 1976; Boycott, 1961; Dubas et al., 1986). Surprisingly, the newly-hatched cuttlefish is already able to produce complex body patterns and behaviours in response to environmental variations (Hanlon and Messenger, 1988). Thus, the 'neural networks' involved in the control of body patterning must develop during embryonic development to be functional at hatching. In this study, we investigate when and how these 'neural networks' appear, and how FMRFamide-related peptides are involved in their development.

To achieve this objective, we studied the distribution of FaRPs during the embryonic development of the cuttlefish. *S. officinalis* is a suitable species for observing this peculiar system of camouflage for several reasons: (i) *S. officinalis* possesses a well-developed body patterning repertoire for camouflage and communication (Hanlon and Messenger, 1988), (ii) the functional organisation of the complex adult nervous system of *S. officinalis* is well characterised (Boycott, 1961), and (iii) this species has been used in several biological assays to characterise the skin patterning control mechanism (Andrews et al., 1981; Loi et al., 1996).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Collection of *Sepia* embryos

The experimental procedures were carried out in strict compliance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and the French legislation requirements (decree 87/848) regarding the care and use of laboratory animals. All efforts were made to minimise animal suffering and to reduce the number of animals used. Eggs from *S. officinalis* were collected immediately after fertilisation from the marine stations of Luc-sur-mer (Caen University, France) and Roscoff (UPMC, France) between April and September 2009. Eggs were kept in tanks with oxygenated seawater at 20 °C. Several eggs were sampled daily to obtain a complete collection of the morphological steps of organogenesis (Lemaire, 1970). Embryos took 30 days to grow and developed directly into juveniles inside a chorion enclosed in numerous dark membranes. These layers were removed in seawater and embryos were anaesthetised in 7% MgCl<sub>2</sub>. For immunohistochemistry, embryos were fixed for 1 h in 3.7% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS 1X, pH 7.2) at room temperature. For *in situ* hybridisation, embryos were fixed overnight within the chorion in 3.7% PFA in PBS 1X (pH 7.2) at 4 °C and then were dechorionated. A second fixation step (3.7% PFA, 24 h) followed. After determining the developmental stage using microscopy, embryos were washed in PBS, dehydrated in baths of increasing methanol concentration (25–100%), and stored at –20 °C in 100% methanol.

### 2.2. Cloning of FaRPs

After the extraction of total RNA from a pool of *S. officinalis* embryos at stages 14–28 using Tri Reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA), cDNAs were obtained by reverse transcription with the Omniscript reverse-transcriptase (Qiagen, Valencia, CA, USA). Polymerase chain reaction (PCR) was performed using a forward

primer, FaRP-F (5'-GCCCTGTCAGGAGATGCTTTC-3', ALSGDAF) and a reverse primer, FaRP-R (5'-GAACCTTGTGCGCTTCTG-3', PEAD-KRF) that were designed based on the full-length cDNA sequence of *S. officinalis* FaRPs (GenBank Accession Number Y11246; Loi and Tublitz, 1997). PCR was conducted with an initial denaturing step (94 °C for 5 min) followed by 35 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72 °C for 1 min and a final extension step at 72 °C for 5 min. The resulting fragments of 668 bp (corresponding to nt 552–1220 of the cDNA sequence of *S. officinalis* FaRPs) included sequences coding for 1 ALSDGLFLRF, 1 FLRF and 8 FMRF. The fragments were cloned into TOPO 4 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for further probe synthesis, were sequenced by GATC Biotech (Konstanz, Germany) and were analysed with BioEdit software (Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA). GenBank BLASTn (BLAST= basic local alignment search tool) analysis confirmed the homology of our sequences with known available FaRP sequences.

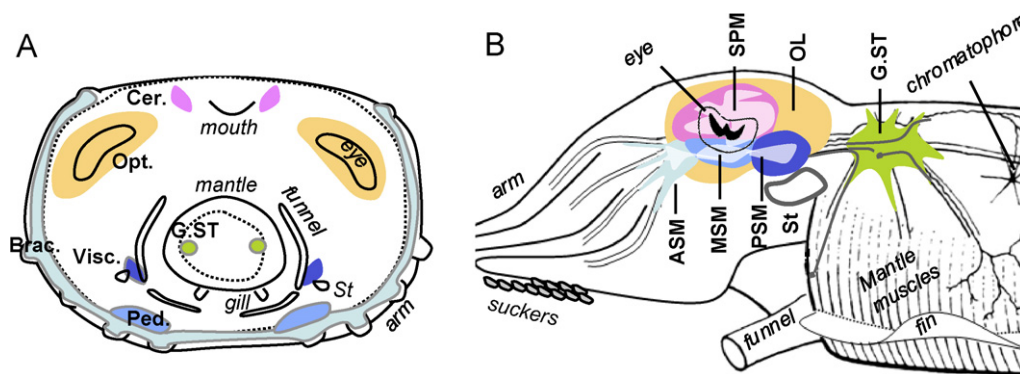
### 2.3. Whole-mount *in situ* hybridisation

The plasmid was digested with appropriate restriction enzymes and digoxigenin-labelled RNA probes were synthesised. Sense probes used as a negative control were obtained using a Sp6-T7<sup>®</sup> kit (Roche, Mannheim, Germany) and antisense probes were synthesised with T3 polymerase (Roche) following the manufacturer's recommendations.

*In situ* hybridisation (ISH) was performed using at least 3 embryos per stage, and controls were done for each stage. After progressive rehydration in PTW/methanol (PBS, 0.1% Tween 20, methanol from 60% to 30%), embryos were treated with proteinase K (10 µg/ml in PTW for 20–50 min depending on the stage of the embryos) and post-fixed for 1 h in 3.7% PFA. Embryos were then prehybridised for 6 h at 65 °C in a hybridisation solution containing 50% deionised formamide, 5X SSC, 0.1% Tween 20, 1% SDS, 25 µg/ml heparin and 100 µg/ml baker's yeast tRNA (Roche). Probes (300 ng/ml) were added, and the hybridisation reaction was carried out at 65 °C overnight. Embryos were then washed in SH solution (50% formamide deionised, 5X SSC, 0.1% Tween 20, 1% SDS) and in 2X SSC. One cycle of RNase A (1 h at 37 °C) was completed to eliminate all non-hybridised probes. For the immunodetection of probes, embryos were equilibrated for 25 min in blocking solution (BS: 100 mM maleic acid and 150 mM NaCl, pH 7.5, 1% Tween 20), saturated in BS containing a 4% blocking reagent (Roche) and a 15% foetal bovine serum for 1 h at room temperature, and then incubated overnight at 4 °C with an anti-digoxigenin antibody coupled with alkaline phosphatase (Roche) diluted to 1:5000. The detection step consisted of observing the alkaline phosphatase activity with the NBT-BCIP (Roche) substrate in 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 9.5), 0.1% Tween 20 and 500 µM levamisole at room temperature (3 h to 3 d depending on the number of transcripts).

### 2.4. Cryosection

Embryos were placed in a gelatin/saccharose phosphate solution (0.12 M phosphate buffer, 12% saccharose, 7.5% gelatin) and then rapidly frozen in liquid isopentane at –80 °C. They were cut into 20 µm sections using a Leica cryostat (CM1510; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Sections were viewed using a Leica M16 2F binocular stereomicroscope and a Leica DMLB microscope and were photographed with a QImaging camera (QImaging, Surrey, BC, Canada). Images were imported into Adobe Photoshop 8.0.1 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) for further editing (overlap, contrast, and brightness).



**Fig. 1.** (A) Schematic drawing of the animal pole of a *Sepia officinalis* embryo in stage 17. Presumptive neural territories are labelled in bold and developing organs are italicised. The yolk membrane surrounding the animal pole is not depicted. (B) Schematic of a recently hatched *S. officinalis*. Adult neural territories, labelled in bold, have the same colour as the presumptive neural territories (in A) from which they derive. Light colours symbolise neuropile areas. Only one optic lobe (the right one) and one eye are presented in the background. *Abbreviations:* ASM, anterior suboesophageal mass; Brac., brachial cord; Cer., cerebral ganglion; G.ST, stellate ganglion; MSM, middle suboesophageal mass; OL, optic lobe; Opt., optic ganglion; Ped., pedal ganglion; PSM, posterior suboesophageal mass; SPM, supraoesophageal mass; St, statocyst; Visc., visceral ganglion.

### 2.5. Immunodetection of FaRPs

Cryosections of embryos were washed in PBS and then immersed in a blocking buffer (PBS/1% bovine serum albumin) for 30 min at room temperature, to reduce nonspecific binding. Sections were then incubated for 2 h at room temperature with a commercial polyclonal antibody produced in rabbits (against the synthetic tetrapeptide FMRFamide; Labomix SA, Nivelles, Belgium) diluted at 1:4000 in blocking buffer (Ac1). After several washing steps in PBS, a second incubation in horse biotinylated anti-rabbit IgG antibody (Ac2) was performed overnight at 4 °C in blocking buffer (dilution 1:100). After additional washing steps in PBS, staining was performed using the Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and 3,3-diaminobenzidine (DAB-nickel Kit, SK-4100; Vector Laboratories), a dark brown-coloured substrate of peroxidase. After 10 min, the colouration was stopped in PBS.

To test the specificity of the antibody, a control experiment was performed in successive sections of a stage 26 embryo using Ac1 after pre-incubation for 4 h with a solution of  $10^{-4}$  M FMRF peptide (Proteogenix, Oberhausbergen, France),  $10^{-4}$  M FLRF peptide (Proteogenix), or  $10^{-4}$  M serotonin as a negative control (Sigma, St. Louis, MO, USA) at 4 °C. The section treated with the serotonin-incubated antibody showed strong staining in different parts of the developing brain (see *Supplementary Fig. S1* in the online version at doi:10.1016/j.zool.2010.11.002). The sections treated with FLRF or FMRF-incubated-antibody did not show this expanded staining; very few areas are labelled (see *Supplementary Fig. S1*). This finding demonstrates that the antibody we used is specific to FaRPs.

### 3. Results

*S. officinalis* undergoes direct development and hatches after 30 days at 20 °C. Embryogenesis can be divided into three main steps: cell cleavage (from stage 1 to 9), gastrulation (from stage 10 to 15) and organogenesis (from stage 16 to hatching), according to *Lemaire's system* (1970). During organogenesis, the embryo is disc-shaped (Fig. 1A) and gains volume to reach its final juvenile form (Fig. 1B; *Naef, 1928; Lemaire, 1970*). During this period, the complex nervous system of the adult cephalopod is formed. Embryonic neural territories are first identified as paired structures, either ganglia or cords, which evolve during the development to form the CNS and PNS. Cerebroid, pedal, brachial and visceral ganglia migrate and fuse, forming the complex brain that, together with the optic lobes, constitutes the CNS (*Shigeno et al., 2001;*

*Yamamoto et al., 2003; Navet et al., 2009*). The PNS is composed of all peripheral ganglia (stellate, buccal, and brachial) and nerve networks.

The distribution of cells expressing the gene coding for *S. officinalis* FaRPs (FaRP-exp cells) and cells immunoreactive to the FMRFamide antibody (FaRP-IR cells) were investigated throughout neurogenesis. Stained FaRP cells were detected in specific areas of the CNS and peripheral regions.

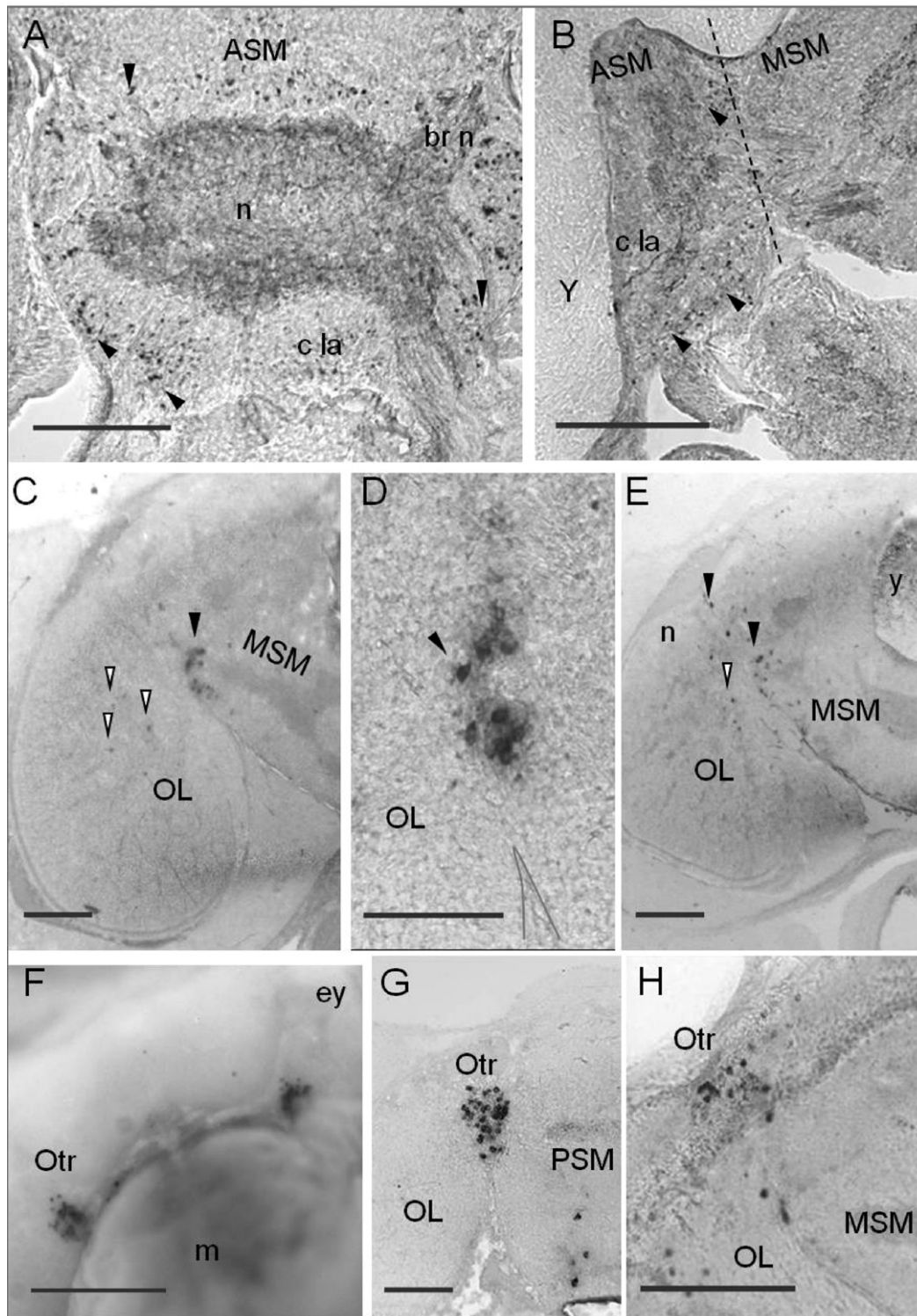
#### 3.1. FaRPs in the developing suboesophageal mass and optic regions

The adult suboesophageal mass of the brain is divided into three regions that are distributed along the anterior–posterior axis (Fig. 1B): the anterior suboesophageal mass (ASM), the middle suboesophageal mass (MSM) and the posterior suboesophageal mass (PSM). These masses are composed of several morphological and functional lobes (*Boycott, 1961; Young, 1971*) that result from the fusion of paired ganglia. The ASM and MSM arise from the brachial and pedal ganglia, and the PSM arises from the visceral ganglia (Fig. 1A and B). The two optic lobes are located on either side of the brain. Each lobe is connected to the brain by an optic tract composed of three different structures: the optic gland, the peduncle lobe and the olfactory lobe.

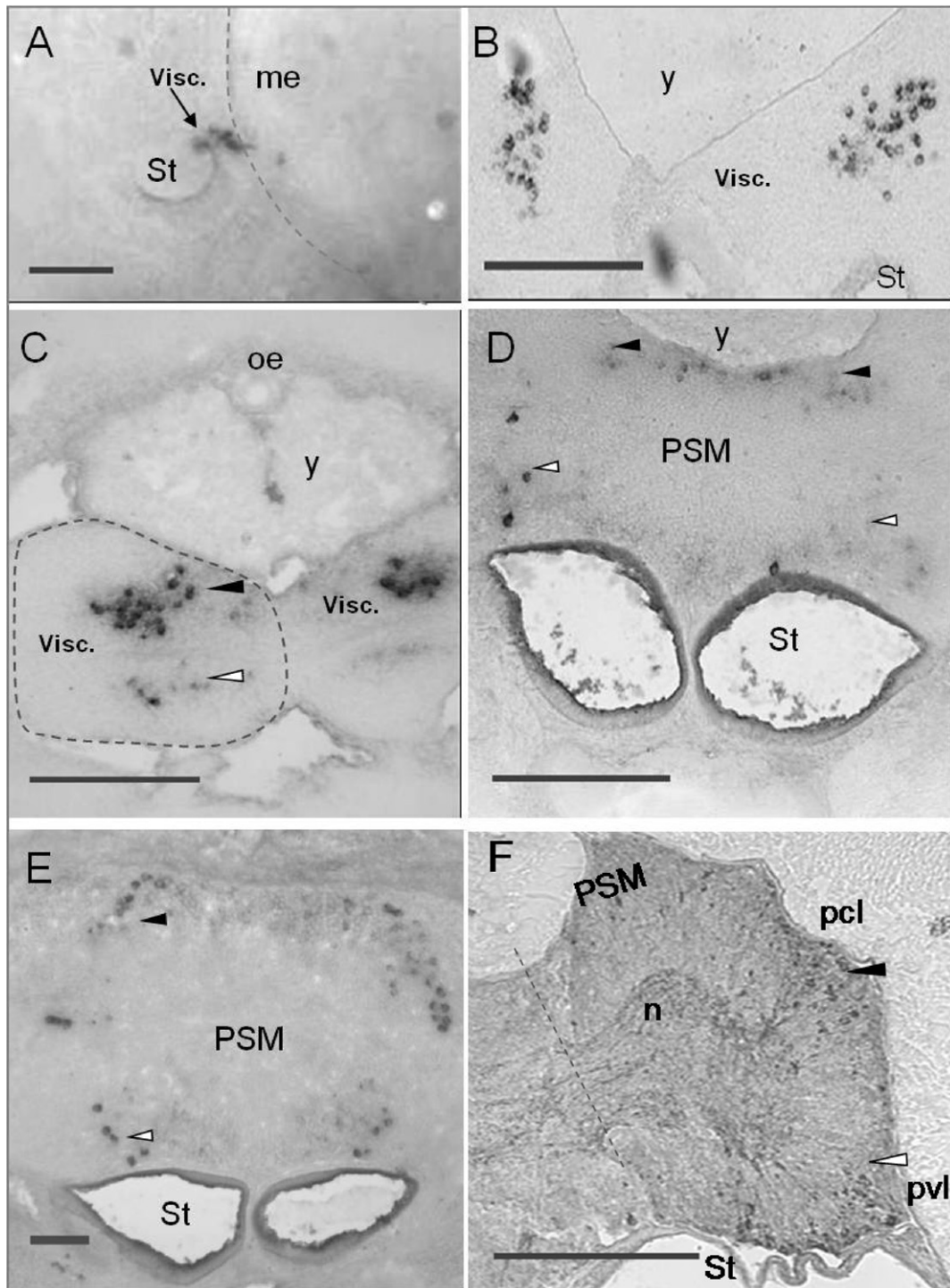
In the ASM, FaRP cells were detected only through immunodetection in stage 29. FaRP-IR cell bodies were distributed around the neuropile at high density in the dorsal and ventro-lateral parts of the brachial lobe. In addition, FaRP-IR stained fibres were observed in the neuropile of the ASM, the MSM and the brachial nerves (Fig. 2A and B).

In the middle suboesophageal mass (MSM), FaRP-exp cells were first detected in stage 23. These cells were located in ipsilateral clusters at the junction between the MSM and the optic lobes (Fig. 2C and D). Later, FaRP-exp cells remained in the lateral part of the MSM but were located more dorsally (Fig. 2E).

In the optic lobe, few FaRP-exp cells were first detected in stage 23 in the medulla near the commissural area (Fig. 2C). In following stages, FaRP-exp cells appeared dispersed in the entire mass of the medulla of the optic lobes. In the same stage, very strong staining was detected in the whole-mount embryo in a restricted area bordering the optic region (Fig. 2F). In section, this staining corresponds to FaRP-exp cells being clearly located in the optic tract region (Fig. 2G). Similar expression sites were observed in each of the following investigated stages (stage 27, Fig. 2H) and were confirmed using immunostaining.



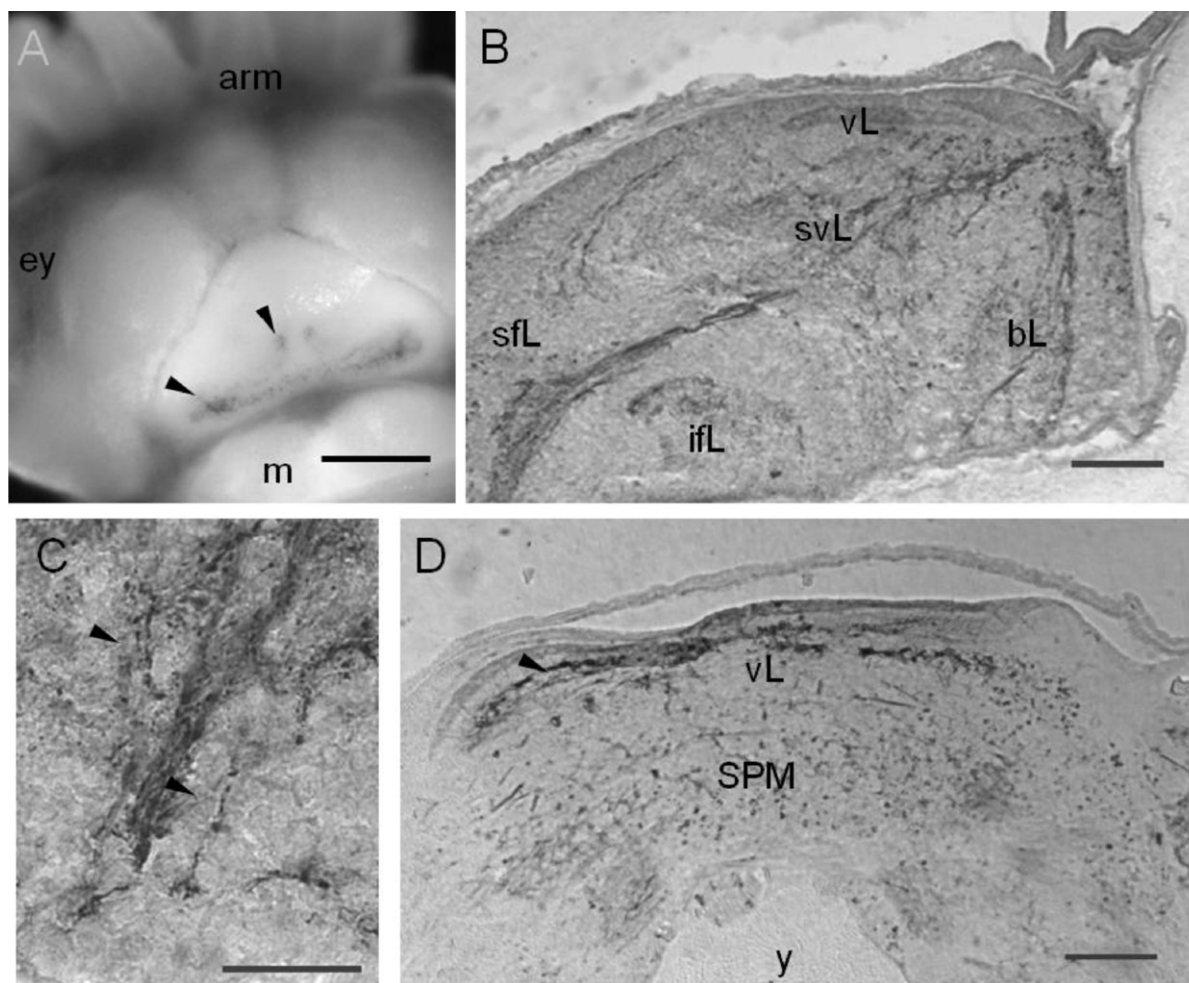
**Fig. 2.** (A) Transverse and (B) longitudinal (anterior to the left) sections through the ASM of a stage 29 embryo showing FaRP immunoreactivity. Stained cell bodies were located in the cell layer (c la) of the ASM (black arrowheads) and stained fibres were observed in the neuropile (n) and the brachial nerves (br n). (C) Transverse section through the optic lobe and the MSM of a stage 23 embryo after *in situ* hybridisation. Stained cell bodies were observed in the medulla of the optic lobe (white arrowheads) and at the optic lobe/MSM junction (black arrowhead). (D) Magnification of the optic tract/MSM junction from the stage 23 embryo showing strongly stained cell bodies (black arrowhead). (E) Transverse section through the optic lobe and the MSM of a stage 26 embryo after *in situ* hybridisation. FMRF-expressing cells appeared dispersed over a large area covering the optic lobe (white arrowhead) and the MSM (black arrowheads). (A–E) Scale bars = 100  $\mu$ m. (F) Apical view of a stage 23 embryo after whole-mount FMRF hybridisation. Clusters of FMRF-expressing cells were detectable in the two optic tract regions (Otr). Scale bar = 200  $\mu$ m. (G–H) Transverse sections of a stage 23 embryo (G) and a stage 27 embryo (H) through the optic lobe and tract after *in situ* hybridisation. A high density of strongly stained cells was detected in the optic tract region. Scale bars = 100  $\mu$ m. **Abbreviations:** ASM, anterior suboesophageal mass; br n, brachial nerve; c la, cellular layer; ey, eye; m, mantle; MSM, median suboesophageal mass; n, neuropile; OL, optic lobe; Otr, optic tract region; PSM, posterior suboesophageal mass; y, yolk.



**Fig. 3.** (A) Apical view of the left visceral ganglion labelled by FMRP hybridisation in a stage 17 embryo. (B and C) Transverse sections through visceral ganglia of embryos in stage 21 (B) and stage 22 (C) after *in situ* hybridisation. In stage 22, two ipsilateral clusters of cells are shown (black and white arrowheads). (D and E) Transverse sections through the anterior part (D) and the posterior part (E) of the PSM of a stage 23 embryo after *in situ* hybridisation. Two ipsilateral clusters of cell bodies can be detected, a dorsal (D) or dorso-lateral (E) cluster (black arrowheads) and a ventral cluster (white arrowheads). (F) Longitudinal section (anterior to the left) through the PSM of a stage 29 embryo. FaRP immunoreactivity was detected in fibres located in the neuropile (n) and in cell bodies located in the posterior chromatophore lobe (pcl, black arrowhead) and in the palliovisceral lobe (pvl, white arrowhead). Scale bars = 100  $\mu$ m. *Abbreviations:* me, mantle edge; n, neuropile; oe, oesophagus; pcl, posterior chromatophore lobe; PSM, posterior suboesophageal mass; pvl, palliovisceral lobe; St, statocyst; Visc., visceral ganglion; y, yolk.

In the developing CNS, the first FaRP-exp cells were detected in stage 17 in the visceral ganglia, close to statocysts on each side of the mantle (Fig. 3A). Later, from stage 20 to stage 22, this expression was maintained in the visceral ganglia, which are joined together (Fig. 3B and C), and FaRP-exp cells were located in the centre of each visceral ganglion (Fig. 3B). In later stages, the visceral ganglia fused,

leading to the PSM, a voluminous and unique mass with bilateral symmetry, where groups of FaRP-exp cells appeared in different areas. In stage 23 (Fig. 3D and E) in the anterior part of the PSM, two groups of FaRP-exp cells were detected. One was located in a ventral position near the statocysts and the other was located in a dorsal position adjacent to the yolk sac (Fig. 3D). In the posterior



**Fig. 4.** (A) Dorsal view of the head of a stage 28 embryo after whole-mount *in situ* hybridisation. Pair clusters of FaRP-exp cells are located in the posterior region of the head close to the mantle edge (black arrowheads). Scale bar = 200  $\mu\text{m}$ . (B) Longitudinal section (anterior to the left) through the SPM of a stage 29 embryo. Immunoreactive cell bodies were mostly located on the posterior part of the SPM (vL, vertical and bL, basal lobes) and stained fibres were observed throughout each lobe of the SPM. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . (C) Magnification of FaRP-IR fibres (black arrowheads) detected in the SPM of a stage 29 embryo. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ . (D) Transverse section through the SPM of a stage 29 embryo showing obvious FaRP-IR cell bodies and fibres (black arrowhead) in the vertical lobe (vL). Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ . *Abbreviations:* bL, basal lobe; ey, eye; ifL, inferior frontal lobe; m, mantle; sfL, superior frontal lobe; SPM, supraoesophageal mass; svL, subvertical lobe; vL, vertical lobe; y, yolk.

region of the PSM, two ipsilateral groups of FaRP-exp cells were observed: one group had a dorso-lateral position and the other a ventral one (Fig. 3E). The FaRP-exp cells had a location similar to that in stage 23 until hatching. FaRP-IR cell bodies were observed in embryos at stages 23, 26 and 29. At stage 29, numerous FaRP-IR cells appeared in the posterior part of the PSM, in areas corresponding dorsally to the posterior chromatophore lobe and ventrally to the palliovisceral lobe (Fig. 3F). In addition, FaRP-IR positive fibres were also detected in the visceral ganglia in stage 23 and inside the neuropile in later stages (Fig. 3F).

### 3.2. FaRPs in the developing supraoesophageal mass

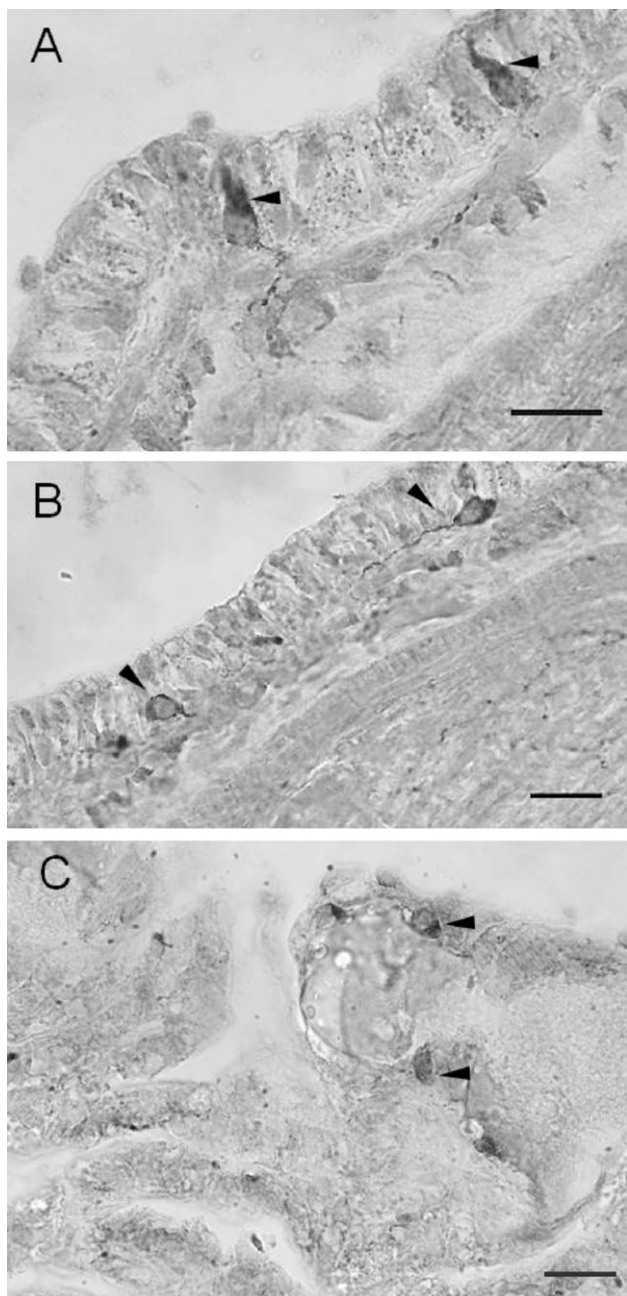
The supraoesophageal mass (SPM) results from the fusion of the cerebroid ganglia and is constituted in adults by three main parts, from anterior to posterior: the frontal, the vertical and the basal lobes. These are subdivided into several smaller lobes, each associated with precise functions (Young, 1971). FaRP-exp cells appeared in the SPM in stage 26 and were observed until hatching. These cells formed a superficial line in the dorsal region of the SPM (Fig. 4A). This region corresponds to the vertical lobe and, in later stages, it showed an increase in FaRP expression as well as production, as

shown by immunodetection (Fig. 4B and D). FaRP-IR fibres were detected inside the neuropiles of each lobe belonging to the SPM (Fig. 4B–D).

### 3.3. FaRPs outside the developing CNS

Outside the developing CNS, FaRP-IR cell bodies were observed in the two stages investigated (26 and 29). Some of these cells were detected within the skin near the dorsal mantle edge (Fig. 5A) and along the arm lines (Fig. 5B). These cells exhibit an apical pole facing the outside and a basal pole prolonged by an axon. FaRP-IR cell bodies were also detected in the developing gills (Fig. 5C).

Moreover, networks of FaRP-IR fibres were found outside the CNS. In the arms, FaRP-IR fibres were found in the central cords (Fig. 6A–C), in the four intramuscular nerve cords (Fig. 6B) and connected to the suckers (Fig. 6C). FaRP-IR fibres were also detected in the neuropile of the stellate ganglia (Fig. 6E) and in the stellate nerves (Fig. 6D and E), throughout the muscles of the mantle (Fig. 6F) and in the dermal layer of the skin (Fig. 6G). In addition, some FaRP-IR signals were detected in the cellular layer of the stellate ganglia and in the subepidermic layer, where chromatophores are located (Fig. 6G).



**Fig. 5.** (A and B) Longitudinal sections through (A) the mantle and (B) arms showing FaRP-IR cell bodies and fibres in the subepidermic cell layer (black arrowheads). Cells exhibited an apical pole and a basal pole prolonged by an axon. (C) Longitudinal section through the developing gills showing FaRP immunoreactivity (black arrowheads). Scale bars = 30  $\mu$ m.

## 4. Discussion

### 4.1. FaRPs in *S. officinalis* and their potential roles during ganglionic stages

In the present study, we have demonstrated that a “FaRP gene” identified in *S. officinalis* (Loi and Tublitz, 1997), which encodes different peptides and ends with a RFamide segment, is expressed during development. Moreover, using immunohistochemistry, we have demonstrated that FaRP mRNAs are translated in embryonic tissues, so there is FaRP peptide production.

Using two methods, ISH to localise FaRP-expressing cells and immunodetection using a polyclonal antibody against FMRamide

to localise FaRPs peptides, we were able to demonstrate differences between the developing CNS, which showed both FaRP ‘productive sites’ and FaRP ‘expressive sites’, and the PNS, where only FaRP ‘productive sites’ were detected. These results can be explained by a low rate of gene expression (or a high translation rate) with an accumulation of peptides in the cells, or by the expression of another gene coding for peptides from the FaRP family.

Our results showed that FaRP-exp cells appear early in embryonic development, when the nervous system has just emerged as ganglia throughout the embryo. These cells are considered to be postmitotic because they are able to express a gene coding for neuropeptides. These results are congruent with the results of our past study showing the presence of postmitotic cells with dendrites and dopaminergic differentiation in some ganglia of embryos at early stages of organogenesis (Baratte and Bonnaud, 2009).

These results regarding cephalopods indicate that, even at early ganglionic stages, there is morphological (appearance of neurites) and functional (production of neuropeptides) cell differentiation.

During *S. officinalis* embryogenesis, the first cells to express FaRPs were located near the statocyst and the mantle edge in the visceral ganglia. This expression is apparently conserved within cephalopods, because similar results have been obtained in *I. notoides* (Wollesen et al., 2010).

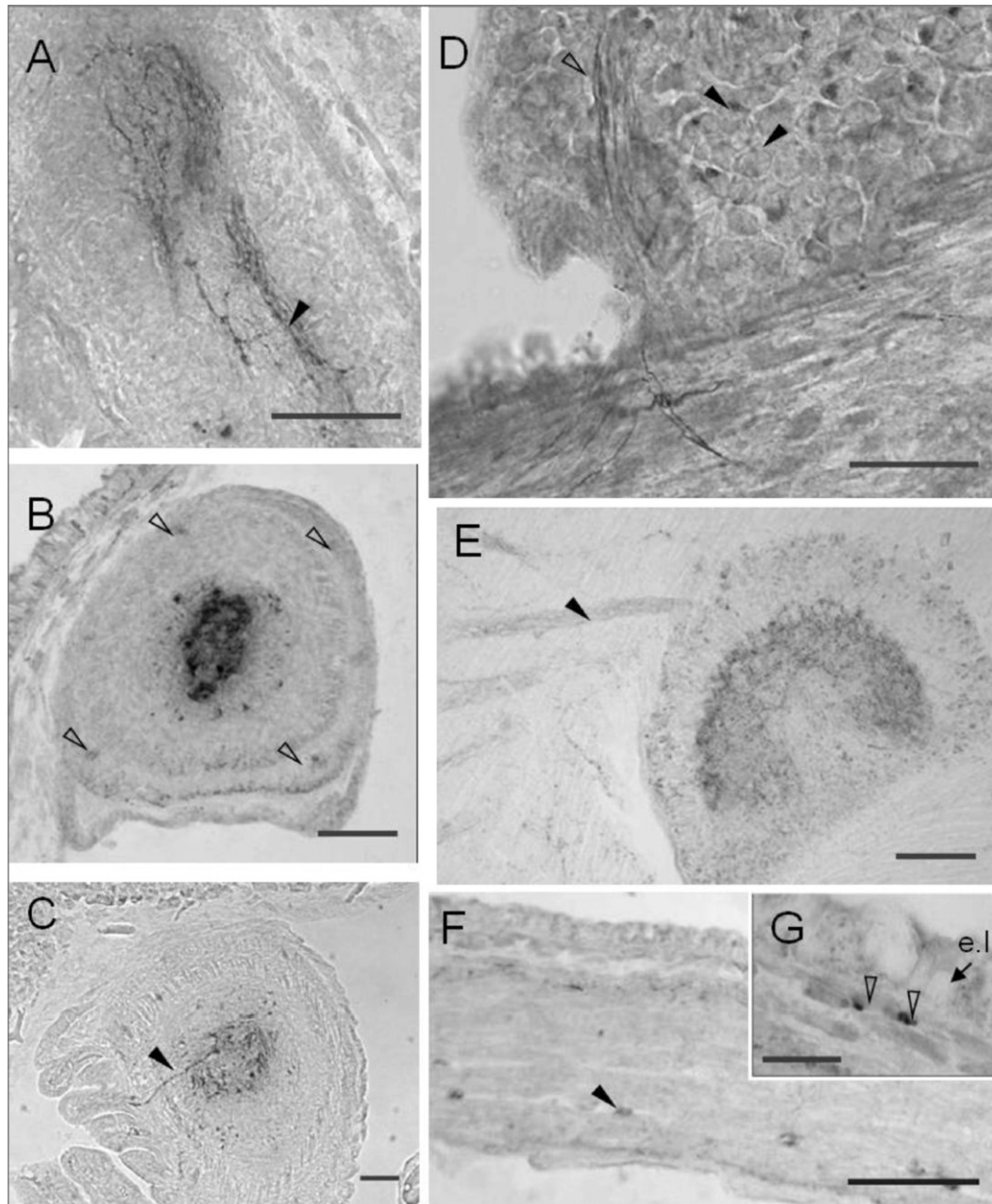
In numerous gastropods, FaRP-IR cells have been found in the nervous system during the early stages of development in the trochophore larvae or early veliger stage, i.e., before metamorphosis (*L. stagnalis*: Croll and Voronezhskaya, 1996; *C. fornicata*: Dickinson et al., 1999; *V. ater*: Franchini, 2005; *A. californica*: Dickinson et al., 2000). This early production of FaRPs in nervous cells led the authors to suggest an early role for FaRPs in axonal navigation and/or in the determination of areas for the future nervous system (Croll and Voronezhskaya, 1996). Indeed, it has been previously shown in other metazoan groups like insects and vertebrates that neurotransmitters may modulate neurodevelopment through the control of morphogenetic events (Buznikov et al., 1996; Lauder, 1988) and by shaping neuronal circuitry (Budnik et al., 1986; Haydon et al., 1987).

Thus, our cuttlefish embryo results suggest that the early ganglionic FaRPs observed may have a role in neuronal organisation by acting as a paracrine factor. Nevertheless, we must consider that, in cephalopods, unlike in gastropods where the first FaRP cells disappeared at the end of larval life, the FaRP cells detected during early developmental steps persist until hatching, indicating their involvement in a cephalopod-specific trait or function.

### 4.2. Putative FaRPs’ role in the developing chromatophore pathway

Several studies performed on various adult cephalopod species have clarified the neural pathway involved in the control of body patterning through chromatophores (Boycott, 1961; Young, 1971; Chichery and Chanelet, 1976; Messenger, 1979; Novicki et al., 1990). Our results obtained during the development of *S. officinalis* showed that FaRP staining takes place in areas involved in the chromatophore response.

The optic lobes seem to initiate a change in body patterning, because electrical stimulation in the medulla of the optic lobes induced several responses, including body colour change (Boycott, 1961; Chichery and Chanelet, 1976). We detected the first FaRP cells concentrated in the centre of the medulla in stage 23. Later, the distribution expanded to the entire medulla of the lobes. Similar distributions of FaRP-IR cells have been described in adults of *O. vulgaris* (Suzuki et al., 2002; Di Cristo et al., 2003) and in adults and embryos of *I. notoides* (Wollesen et al., 2008, 2010). The optic lobes are described as a system that is able to code, store and decode visual inputs to produce relevant motor responses (Young, 1962).



**Fig. 6.** (A) Longitudinal and (B and C) transverse sections through an arm of a stage 29 embryo. FaRP-IR fibres constituting a network were detected inside the cerebrobrachial tract (A) and intramuscular nerve cords (B, white arrowheads) and connected to suckers (C, black arrowhead). (D) Magnification of FaRP-IR fibres (white arrowhead) and FaRP signals (black arrowheads) detected in the stellate ganglia of a stage 26 embryo. (E) Section through the stellate ganglia and stellate nerves (black arrowhead) of a stage 29 embryo showing FaRP-IR fibres. (F) Transverse section through the mantle and (G) the skin of a stage 29 embryo showing FaRP immunoreactivity in the stellate nerves (black arrowhead) and the dermis (white arrowheads). Scale bars in A, D, F = 20  $\mu\text{m}$ ; in B, C, E = 50  $\mu\text{m}$ ; in G = 5  $\mu\text{m}$ . Abbreviation: e.l., epidermal layer.

The existence of FaRP-IR cells in the developing optic lobes of the late embryo supports the role of FaRPs in the modulation of visual efferent and afferent information, as in adults (Suzuki et al., 2002). This idea is congruent with the ability of embryos to detect visual cues inside the egg, indicating that a functional nervous pathway exists between eye and brain through the optic lobes at the end of embryogenesis (Darmaillacq et al., 2008).

The optic lobes are connected to the brain via the optic tracts, where different structures are located, including the peduncle lobe, the olfactory lobe and the optic gland. Efferent fibres from the optic lobes project widely into the peduncle and the basal lobes (Cajal, 1917; Boycott, 1961; Young, 1971; Messenger, 1979, 2001). The nervous optic tract structures (peduncle and olfactory lobes) are implicated in the control of chromatophores (for a review, see

Boycott, 1961) and the basal lobes, described as a 'higher motor centre' in *S. officinalis* (Boycott, 1961) and in *O. vulgaris* (Young, 1971). The main efferent fibres of the basal lobes extend to the chromatophore lobes (*Octopus*: Young, 1971; *Sepia*: Boycott, 1961; *Loligo*: Young, 1976; Novicki et al., 1990).

In *S. officinalis* embryos, we detected FaRP-exp and FaRP-IR cells from stage 23 until hatching in the optic tract region and in the basal lobes. These results are comparable to those obtained in several adult cephalopods (*S. officinalis*: Le Gall et al., 1988; Henry et al., 1999; *I. notoides*: Wollesen et al., 2008; *O. vulgaris*: Di Cosmo and Di Cristo, 1998; Suzuki et al., 2002), and recently in embryos of *I. notoides* (Wollesen et al., 2010).

From stage 17 to 29, FaRP-exp cells or FaRP-IR cells were also observed in three areas of the developing posterior suboesophageal



mass (PSM), described and named in adults and embryos as the fin lobe (FL), the posterior chromatophore lobe (PCL) and the palliovisceral lobe (PVL). Moreover, we detected FaRP-IR fibres in different organs, including the stellate ganglia, the stellate nerves and the subepidermic layer of the skin. In adult *S. officinalis*, FaRP-IR cells were detected in the same PCL and FL (Loi and Tublitz, 2000), indicating a maintained role of FaRPs in these areas from the embryo to the adult. Motor neurone cell bodies situated in the PCL project their axons through the stellate ganglia toward the chromatophore neuromuscular junction in *O. vulgaris* (Sereni and Young, 1932) and *L. brevis* (Dubas et al., 1986). The PCL is known to intervene in a motor function, namely the control of the expansion or retraction of chromatophores located in the fins and mantle (Boycott, 1961; Gaston and Tublitz, 2004). In addition, several studies performed on adult *S. officinalis* and recently on *S. lessoniana* demonstrated the involvement of FaRPs (FMRFamide, FLRFamide, FIRFamide, ALSGDAFLRFamide) in the chromatophore neuromuscular junction (Loi and Tublitz, 1997; Loi et al., 2005; Tublitz et al., 2006; Suzuki et al., 2009).

In the present study, during neurogenesis we observed (i) FaRP-IR cell bodies in the PCL, (ii) FaRP-IR fibres through the palliovisceral nerve and stellate ganglia, and (iii) FaRP-IR signals in the dermis.

Thus, all FaRP staining observed throughout the developing CNS might correspond to the implementation of neuronal networks involved in the control of colouration patterns. This finding suggests that a 'FaRPs pathway' exists in *S. officinalis*, which runs through the optic lobes, the optic tracts, the basal lobe and the chromatophore lobe to act on the chromatophores.

#### 4.3. Other potential roles of FaRPs in embryos

In addition to the areas potentially implicated in the control of body patterning, FaRP staining has also been observed in other areas of the nervous system during *S. officinalis* embryogenesis. One area, located in the CNS, is the dorsal part of the supraoesophageal mass (SPM) corresponding to the vertical lobe. The first FaRP-exp cells appeared dispersed in the vertical lobe in stage 26. Then, throughout later stages, the number of FaRP-exp cells increased, and in stage 29, strong networks of FaRP-IR neurones were observed. Similar results were obtained in *I. notoides* (Wollesen et al., 2010), but no FaRP-IR cell bodies were observed in the frontal lobe of *S. officinalis* embryos during this study. Nevertheless, FaRP-IR fibres were observed in several lobes of the SPM, including the frontal lobes. The vertical and frontal lobes have been described as a centre of memory and learning (Sanders and Young, 1940; Boycott and Young, 1955; Boycott, 1961; Young, 1971). Thus, the FaRPs produced in these areas could be involved in these functions or in communication between the different brain lobes.

The differences observed between *I. notoides* and *S. officinalis* could be related to a species-specific differentiation of FaRP cells. Despite the strong similarities between cephalopod nervous systems, there are differences. Different brain lobe proportions have been found. In *I. paradoxus*, 'characteristically small chromatophore lobes' were described (Shigeno and Yamamoto, 2002), most likely related to the fact that this animal's living strategy does not necessitate a complex chromatophore pattern for camouflage. The developmental changes in lobes of the brain could reflect changes in habitats and behaviour (Nixon and Young, 2003).

FaRP-IR fibres were detected in different peripheral structures such as the arms, suckers and muscles. In contrast to the CNS, no stained cell bodies were observed in these structures, suggesting that these FaRP fibres run from the brain to muscles like motor fibres. Thus, they could originate from the brachial lobe where FaRP-IR cell bodies and fibres have been detected. These results suggest an involvement of FaRPs in other motor functions such as

the control of arm movements. FaRPs also seem to be involved in sensory functions. Indeed, FaRP-IR cell bodies have been detected in the subepidermic layer of the skin, as observed by Mackie (2008) in *L. opalescens*.

## 5. Conclusion

In summary, we have demonstrated an early appearance and implementation of FaRP neuronal networks during *S. officinalis* development. Because of their distribution, FaRPs could act as neurotransmitters or neuromodulators. Moreover, they could be involved with specific 'embryonic' functions (such as an involvement in neurogenesis) or could be a catalyst in 'adult' functions (such as the control of chromatophores). This distribution also supports the existence of a FaRP pathway that runs from the optic lobe to the chromatophore muscles via the basal and chromatophore lobes. Additional molecular (on FaRP receptor distribution) or physiological studies (on local inhibition) are necessary to clarify the function of this FaRP pathway.

## Acknowledgements

We are grateful to Y. Bassaglia for helpful discussions. We would like to thank J. Henry (University of Caen), S. Henry, L. Lévêque, and X. Bailly (Roscoff Biology Station – UPMC) for providing biological materials. We would also like to thank T.M. Haug for ensuring the grammatical accuracy of the English manuscript. This work was supported by research grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR JC/JC 0043).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.zool.2010.11.002.

## References

- Andrews, P.L., Messenger, J.B., Tansey, E.M., 1981. Colour changes in cephalopods after neurotransmitter injection into the cephalic aorta. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 213, 93–99.
- Baratte, S., Bonnaud, L., 2009. Evidence of early nervous differentiation and early catecholaminergic sensory system during *Sepia officinalis* embryogenesis. *J. Comp. Neurol.* 517, 539–549.
- Boycott, B.B., 1961. The functional organization of the brain of the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 153, 503–534.
- Boycott, B.B., Young, J.Z., 1955. A memory system in *Octopus vulgaris* Lamarck. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 143, 449–480.
- Budnik, V., Martin-Morris, L., White, K., 1986. Perturbed pattern of catecholamine-containing neurons in mutant *Drosophila* deficient in the enzyme dopa decarboxylase. *J. Neurosci.* 6, 3682–3691.
- Buznikov, G.A., Shmukler, Y.B., Lauder, J.M., 1996. From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development? *Cell. Mol. Neurobiol.* 16, 537–559.
- Cajal, S.R., 1917. Contribucion al conocimiento de la retina y centros opticos de los cefalopodos. *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Mad.* 15, 1–83.
- Chartrel, N., Tsutsui, K., Costentin, J., Vaudry, H., 2006. The RFamide-related peptides. In: Kastin, A.J. (Ed.), *Handbook of Biologically Active Peptides*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 779–785.
- Chichery, R., Chanelet, J., 1976. Motor and behavioural responses obtained by stimulation with chronic electrodes of the optic lobe of *Sepia officinalis*. *Brain Res.* 105, 525–532.
- Chrachri, A., Williamson, R., 2003. Modulation of spontaneous and evoked EPSCs and IPSCs in optic lobe neurons of cuttlefish *Sepia officinalis* by the neuropeptide FMRF-amide. *Eur. J. Neurosci.* 17, 526–536.
- Cottrell, G.A., Price, D.A., Greenberg, M.J., 1981. FMRFamide-like activity in the ganglia and in a single identified neurone of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 70, 103–107.
- Cottrell, G.A., Lin, J.W., Llinas, R., Price, D.A., Sugimori, M., Stanley, E.F., 1992. FMRFamide-related peptides potentiate transmission at the squid giant synapse. *Exp. Physiol.* 77, 881–889.
- Croll, R.P., Voronezhskaya, E.E., 1996. Early elements in gastropod neurogenesis. *Dev. Biol.* 173, 344–347.
- Darmaillacq, A.S., Lesimple, C., Dickel, L., 2008. Embryonic visual learning in the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Anim. Behav.* 76, 131–134.

- Di Cosmo, A., Di Cristo, C., 1998. Neuropeptidergic control of the optic gland of *Octopus vulgaris*: FMRF-amide and GnRH immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 398, 1–12.
- Di Cristo, C., Paolucci, M., Iglesias, J., Sanchez, J., Di Cosmo, A., 2002. Presence of two neuropeptides in the fusiform ganglion and reproductive ducts of *Octopus vulgaris*: FMRFamide and gonadotropin-releasing hormone (GnRH). *J. Exp. Zool.* 292, 267–276.
- Di Cristo, C., Delli Bovi, P., Di Cosmo, A., 2003. Role of FMRFamide in the reproduction of *Octopus vulgaris*: molecular analysis and effect on visual input. *Peptides* 24, 1525–1532.
- Dickinson, A.J., Nason, J., Croll, R.P., 1999. Histochemical localization of FMRFamide, serotonin and catecholamines in embryonic *Crepidula fornicata* (Gastropoda, Prosobranchia). *Zoomorphology* 119, 49–62.
- Dickinson, A.J., Croll, R.P., Voronezhskaya, E.E., 2000. Development of embryonic cells containing serotonin, catecholamines, and FMRFamide-related peptides in *Aplysia californica*. *Biol. Bull.* 199, 305–315.
- Dubas, F., Leonard, R.B., Hanlon, R.T., 1986. Chromatophore motoneurons in the brain of the squid *Lolliguncula brevis*: an HRP study. *Brain Res.* 374, 21–29.
- Espinoza, E., Carrigan, M., Thomas, S.G., Shaw, G., Edison, A.S., 2000. A statistical view of FMRFamide neuropeptide diversity. *Mol. Neurobiol.* 21, 35–56.
- Franchini, A., 2005. The distribution of cells containing FMRFamide- and 5-HT-related molecules in the embryonic development of *Viviparus ater* (Mollusca Gastropoda). *Eur. J. Histochem.* 49, 301–308.
- Gaston, M.R., Tublitz, N.J., 2004. Peripheral innervation patterns and central distribution of fin chromatophore motoneurons in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *J. Exp. Biol.* 207, 3089–3098.
- Hanlon, R.T., Messenger, J.B., 1988. Adaptive coloration in young cuttlefish (*Sepia officinalis* L.): the morphology and development of body patterns and their relation to behaviour. *Philos. Trans. R. Soc. London B* 320, 437–487.
- Haydon, P.G., McCobb, D.P., Kater, S.B., 1987. The regulation of neurite outgrowth, growth cone motility, and electrical synaptogenesis by serotonin. *J. Neurobiol.* 18, 197–215.
- Henry, J., Zatylny, C., Boucaud-Camou, E., 1999. Peptidergic control of egg-laying in the cephalopod *Sepia officinalis*: involvement of FMRFamide and FMRFamide-related peptides. *Peptides* 20, 1061–1070.
- Heyliger, S.O., Payza, K., Rothman, R.B., 1998. The effect of FMRFamide analogs on [35S]GTP-gamma-S stimulation in squid optic lobes. *Peptides* 19, 739–747.
- Khan, H.R., Price, D.A., Doble, K.E., Greenberg, M.J., Saleuddin, A.S., 1998. FMRFamide-related peptides, partial serotonin depletion, and osmoregulation in *Helisoma duryi* (Mollusca: Pulmonata). *J. Comp. Neurol.* 393, 25–33.
- Lauder, J.M., 1988. Neurotransmitters as morphogens. *Prog. Brain Res.* 73, 365–387.
- Le Gall, S., Féral, C., Van Minnen, J., Marchand, C.R., 1988. Evidence for peptidergic innervation of the endocrine optic gland in *Sepia* by neurons showing FMRFamide-like immunoreactivity. *Brain Res.* 462, 83–88.
- Lemaire, J., 1970. Table de développement embryonnaire de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). *Bull. Soc. Zool. Fr.* 95, 773–782.
- Li, C., Kim, K., Nelson, L.S., 1999. FMRFamide-related neuropeptide gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Brain Res.* 848, 26–34.
- Loi, P.K., Tublitz, N., 1997. Molecular analysis of FMRFamide- and FMRFamide-related peptides (FaRPS) in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *J. Exp. Biol.* 200, 1483–1489.
- Loi, P.K., Tublitz, N.J., 2000. Roles of glutamate and FMRFamide-related peptides at the chromatophore neuromuscular junction in the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *J. Comp. Neurol.* 420, 499–511.
- Loi, P., Saunders, R., Young, D., Tublitz, N., 1996. Peptidergic regulation of chromatophore function in the European cuttlefish *Sepia officinalis*. *J. Exp. Biol.* 199, 1177–1187.
- Loi, P.K., Tublitz, N.J., Gaston, M.R., 2005. Neural control of body patterning in the European cuttlefish *Sepia officinalis*. *Integr. Comp. Biol.* 45, 1034–11034.
- Lopez-Vera, E., Aguilar, M.B., Heimer de la Cotera, E.P., 2008. FMRFamide and related peptides in the phylum mollusca. *Peptides* 29, 310–317.
- Mackie, G.O., 2008. Immunostaining of peripheral nerves and other tissues in whole mount preparations from hatchling cephalopods. *Tissue Cell* 40, 21–29.
- Messenger, J.B., 1979. Nervous System of *Loligo* 4. Peduncle and olfactory lobes. *Philos. Trans. R. Soc. London B* 285, 275–307.
- Messenger, J.B., 2001. Cephalopod chromatophores: neurobiology and natural history. *Biol. Rev.* 76, 473–528.
- Naef, A., 1928. Die Cephalopoden (Embryologie). Bardi (Roma), Friedländer & Sons (Berlin).
- Navet, S., Andouche, A., Baratte, S., Bonnaud, L., 2009. *Shh* and *Pax6* have unconventional expression patterns in embryonic morphogenesis in *Sepia officinalis* (Cephalopoda). *Gene Expr. Patterns* 9, 461–467.
- Nichols, R., 2003. Signaling pathways and physiological functions of *Drosophila melanogaster* FMRFamide-related peptides. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 485–503.
- Nixon, M., Young, J.Z., 2003. The Brains and Lives of Cephalopods. Oxford University Press, Oxford.
- Novicki, A., Budelmann, B.U., Hanlon, R.T., 1990. Brain pathways of the chromatophore system in the squid *Lolliguncula brevis*. *Brain Res.* 519, 315–323.
- Orchard, I., Lange, A.B., Bendena, W.G., 2001. FMRFamide-related peptides: a multifunctional family of structurally related neuropeptides in insects. *Adv. Insect Physiol.* 28, 267–329.
- Price, D.A., Greenberg, M.J., 1977. Purification and characterization of a cardioexcitatory neuropeptide from the central ganglia of a bivalve mollusc. *Prep. Biochem.* 7, 261–281.
- Sanders, F.K., Young, J.Z., 1940. Learning and other functions of the higher nervous centers of *Sepia*. *J. Neurophysiol.* 3, 501–526.
- Schaefer, M., Picciotto, M.R., Kreiner, T., Kaldany, R.R., Taussig, R., Scheller, R.H., 1985. *Aplysia* neurons express a gene encoding multiple FMRFamide neuropeptides. *Cell* 41, 457–467.
- Schot, L.P., Boer, H.H., 1982. Immunocytochemical demonstration of peptidergic cells in the pond snail *Lymnaea stagnalis* with an antiserum to the molluscan cardioactive tetrapeptide FMRF-amide. *Cell Tissue Res.* 225, 347–354.
- Sereni, E., Young, J.Z., 1932. Nervous degeneration and regeneration in Cephalopods. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* 12, 173–208.
- Shigeno, S., Yamamoto, M., 2002. Organization of the nervous system in the pygmy cuttlefish, *Idiosepius paradoxus* ortmann (Idiosepiidae Cephalopoda). *J. Morphol.* 254, 65–80.
- Shigeno, S., Tsuchiya, K., Segawa, S., 2001. Embryonic and paralarval development of the central nervous system of the loliginid squid *Sepioteuthis lessoniana*. *J. Comp. Neurol.* 437, 449–475.
- Suzuki, H., Yamamoto, T., Nakagawa, M., Uemura, H., 2002. Neuropeptide Y-immunoreactive neuronal system and colocalization with FMRFamide in the optic lobe and peduncle complex of the octopus (*Octopus vulgaris*). *Cell Tissue Res.* 307, 255–264.
- Suzuki, M., Kimura, T., Ogawa, H., Hotta, K., Oka, K., 2009. FMRFamide elicits chromatophore expansion and retraction depending on its type and development in the squid *Sepioteuthis lessoniana*. *Invert. Neurosci.* 9, 185–193.
- Too, C.K., Croll, R.P., 1995. Detection of FMRFamide-like immunoreactivities in the sea scallop *Placopecten magellanicus* by immunohistochemistry and western blot analysis. *Cell Tissue Res.* 281, 295–304.
- Tublitz, N.J., Gaston, M.R., Loi, P.K., 2006. Neural regulation of a complex behavior: body patterning in cephalopod molluscs. *Integr. Comp. Biol.* 46, 880–889.
- Walker, R.J., Papaioannou, S., Holden-Dye, L., 2009. A review of FMRFamide- and RFAamide-like peptides in metazoa. *Invert. Neurosci.* 9, 111–153.
- Wollesen, T., Loesel, R., Wanninger, A., 2008. FMRFamide-like immunoreactivity in the central nervous system of the cephalopod mollusc *Idiosepius notoides*. *Acta Biol. Hung.* (59 Suppl.), 111–116.
- Wollesen, T., Cummins, S.F., Degnan, B.M., Wanninger, A., 2010. FMRFamide gene and peptide expression during central nervous system development of the cephalopod mollusk *Idiosepius notoides*. *Evol. Dev.* 12, 113–130.
- Yamamoto, M., Shimazaki, Y., Shigeno, S., 2003. Atlas of the embryonic brain in the pygmy squid *Idiosepius paradoxus*. *Zool. Sci.* 20, 163–179.
- Young, J.Z., 1962. The optic lobes of *Octopus vulgaris*. *Philos. Trans. R. Soc. London B* 245, 19–58.
- Young, J.Z., 1971. The Anatomy of the Nervous System of *Octopus vulgaris*. Oxford University Press, Oxford.
- Young, J.Z., 1974. The central nervous system of *Loligo* I. The optic lobe. *Philos. Trans. R. Soc. London B* 267, 263–302.
- Young, J.Z., 1976. The nervous system of *Loligo* II. Suboesophageal centres. *Philos. Trans. R. Soc. London B* 274, 101–167.

Article n°2

Mattiello, T.; Costantini, M.; Di Matteo, B.; Livigni, S.; Andouche, A.; Bonnaud, L. & Palumbo, A. (2012). The dynamic nitric oxide pattern in developing cuttlefish *Sepia officinalis*. *Developmental Dynamics*, 241(2):390-402.

# The Dynamic Nitric Oxide Pattern in Developing Cuttlefish *Sepia Officinalis*

Teresa Mattiello,<sup>1</sup> Maria Costantini,<sup>1</sup> Bruna Di Matteo,<sup>1</sup> Sonia Livigni,<sup>1</sup> Aude Andouche,<sup>2</sup> Laure Bonnaud,<sup>2,3</sup> and Anna Palumbo<sup>1\*</sup>

**Background:** Nitric oxide (NO) is implied in many important biological processes in all metazoans from porifera to chordates. In the cuttlefish *Sepia officinalis* NO plays a key role in the defense system and neurotransmission. **Results:** Here, we detected for the first time NO, NO synthase (NOS) and transcript levels during the development of *S. officinalis*. The spatial pattern of NO and NOS is very dynamic, it begins during organogenesis in ganglia and epithelial tissues, as well as in sensory cells. At later stages, NO and NOS appear in organs and/or structures, including Hoyle organ, gills and suckers. Temporal expression of NOS, followed by real-time PCR, changes during development reaching the maximum level of expression at stage 26. **Conclusions:** Overall these data suggest the involvement of NO during cuttlefish development in different fundamental processes, such as differentiation of neural and nonneural structures, ciliary beating, sensory cell maintaining, and organ functioning. *Developmental Dynamics* 241:390–402, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** nitric oxide; nitric oxide synthase; *Sepia officinalis* development

## Key findings:

- NO is endogenously synthesized in all developmental stages of the cuttlefish *Sepia officinalis*.
- The spatial pattern of NO and NOS is very dynamic and concerns both superficial and internal structures.
- NO could be involved in important functional processes providing new insights in this emerging model for developmental studies.

Accepted 30 November 2011

## INTRODUCTION

Nitric oxide (NO) is an important physiological messenger produced by oxidation of L-arginine catalyzed by the enzyme NO synthase (NOS). NO and NOS are present in all metazoans from placozoans to vertebrates (Palumbo, 2005; Andreakis et al., 2011). Despite being a simple molecule, NO is a fundamental player in the fields of neuroscience, physiology and immunology. In nonvertebrates, NO

is suggested in many processes, including feeding, environmental stress, defense, blood sucking, bioluminescence, neural transmission, blood pressure regulation, immune response, swimming, regeneration processes (Palumbo, 2005; Palumbo and d'Ischia, 2007; Colasanti et al., 2010).

In the cuttlefish *Sepia officinalis*, NO plays a key role in the defense system, regulating the metabolism of

the ink gland and the activity of chromatophores (Palumbo et al., 2000; Fiore et al., 2004; Mattiello et al., 2010). Moreover, NO functions as neurotransmitter in the central and peripheral nervous system, regulates blood pressure acting as vasodilatory mediator, modulates the statocyst activity and participates in manipulative behavior (Schipp and Gebauer, 1999; Palumbo et al., 1999; Tu and Budelmann, 2000; Di Cosmo et al.,

<sup>1</sup>Laboratory of Cellular and Developmental Biology, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Naples, Italy

<sup>2</sup>Laboratory Biologie des Organismes Aquatiques et Ecosystèmes, UMR CNRS 7208, Museum National d'Histoire Naturelle, DMPA, Paris, France

<sup>3</sup>Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité Paris, France

Grant sponsor: ASSEMBLE Grant Agreement; Grant number: 227799.

\*Correspondence to: Anna Palumbo, Laboratory of Cellular and Developmental Biology, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Naples, Italy. E-mail: palumbo@szn.it

DOI 10.1002/dvdy.23722

Published online 3 January 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

2000; Halm et al., 2003; Di Cristo et al., 2007).

Increasing evidence indicates that the role of NO is not only limited to adult metazoans. In vertebrates NO has been shown to affect a variety of processes, including neuron morphogenesis in zebrafish, cell proliferation and movements in *Xenopus*, preimplantation embryo development in mouse (Tranguch et al., 2003; Peunova et al., 2007; Bradley et al., 2010). Regarding lophotrochozoan mollusca scattered observation from the literature indicates the involvement of NO in developmental processes in gastropods. In particular, in the pond snail *Lymnaea stagnalis* NO regulates feeding activity, locomotion and heartbeat during embryonic development (Serfözö and Elekes, 2002). In *Helisoma trivolvis* NO stimulates in early embryonic development ciliary beating of embryos within the egg capsule (Cole et al., 2002). NO is also involved in neuronal development in some molluscs (Thavaradhara and Leise, 2001; Welshhans and Rehder, 2007) as well as in echinoderms (Bishop and Brandhorst, 2007). Moreover, NO is involved in different steps of the biological cycle, from fertilization to metamorphosis. In sea urchins, NO is produced in sea urchin eggs at fertilization, where it mobilizes intracellular calcium stores, regulates the duration of calcium transient and fertilization envelope hardening (Willmott et al., 1996; Leckie et al., 2003; Mohri et al., 2008). In the same time, NO regulates metamorphosis of sea urchins, ascidians and mollusc gastropods (Froggett and Leise, 1999; Bishop and Brandhorst, 2001, 2003; Bishop et al., 2001, 2008; Leise et al., 2004; Hens et al., 2006; Comes et al., 2007; Pechenik et al., 2007). In mollusc cephalopods, the development is direct, without any metamorphosis phase and up to now no information is available on the role of NO during development in such embryos that are protected by envelopes until hatching where they resemble an adult. The cuttlefish *Sepia officinalis* represents an emerging model for developmental studies for its biological features, wide natural distribution, commercial value and increasing availability of molecular biology tools. The direct development of *Sepia* offers the advantage to follow

the continuity of developmental processes; i.e., without changes of body plan as in most other mollusc species. In numerous gastropods, that have a trochophore larvae stage, deep modifications of systems (e.g., nervous and digestive) and molecular processes underlying them occur. Moreover, the originality and differences in gene/protein expression and in the molecular pathways have allowed to evidence specificities in the molecular networks implied in the development of this species. The studies on the expression patterns of *NK4*, *engrailed*, *Shh*, *Pax6* genes during *Sepia* development have provided some insights into nervous system differentiation, organization of the mantle, muscle formation and development (Baratte et al., 2007; Navet et al., 2008, 2009; Grimaldi et al., 2008). Recently, the expression of branchial acid-base transporters has been followed during development and in response to environmental hypercapnia (Hu et al., 2011). In *S. officinalis* characterized by several morphological peculiarities within mollusc and a direct development, we report the presence of NO in embryos by detecting NO and NOS enzyme and by monitoring *NOS* expression levels during the various developmental stages.

## RESULTS

### *S. officinalis* Development

*S. officinalis* develops directly without larval stage and metamorphosis. Development takes around 2 months at 20°C and 30 stages are characterized (Lemaire, 1970). Organogenesis proceeds during 2 to 3 weeks, from stage 14 to hatching at stage 30, giving rise to a juvenile identical to adult with a necto-benthic mode of life (Boletzky et al., 2006). From fertilization to stage 12, a discoidal cleavage at the animal pole of the egg leads to an embryo shaped as a disk lying on the yolk mass. At stage 14, the organogenesis begins: mantle with a central invagination initiating the shell sac responsible of the shell formation, optic vesicle, arm buds are delimited (Lemaire, 1970; Naef, 1928). At stage 17–18, the development of the visceral mass beneath the shell sac provokes the inflation of the mantle region. In the same time all the nerv-

ous ganglia differentiate in distinct area of the embryo (Fig. 1A). At stage 20, gills are covered by the mantle in the pallial cavity, the shell sac is closed. From stage 21, the cephalopodium inflates as most embryonic ganglia converge and become the prospective brain lobes (Fig. 1B). The adult shape is reached at around stage 22 (Fig. 1C). The future visceropallium (mantle, visceral mass, funnel, and mantle cavity) acquires a posterior position by sorting out of the embryo and the future cephalopodium (the prospective head and arms) congregates in an anterior position. The arms and tentacles grow and the suckers differentiate. The brain is constituted from differentiated lobes and located either in the supraesophageal part or in the subesophageal part; it is strikingly linked to the optic lobes (Fig. 1D).

### Dynamic NO and NOS Detection Patterns in *S. officinalis* Embryos

The endogenous NO localization during development was evaluated using DAF-FM-DA, a sensitive cell-permeable and nonfluorescent reagent that combines with the NO oxidation product  $N_2O_3$  to form a fluorescent benzotriazole. This probe is commonly used for imaging intracellular NO in biological systems, including cephalopods (Mattiello et al., 2010; Romano et al., 2011; Paul et al., 2011). The presence of NOS was revealed by immunostaining using an antibody generated to a peptide of a conserved region in all known animal NOSs.

Both NO and NOS appear localized in the ganglia area and restricted in superficial tissues in the early embryos (stage 18). From stage 20 the cell-specific production of NO is extended in superficial tissues and appears in deep organs and/or structures.

### Stage 18

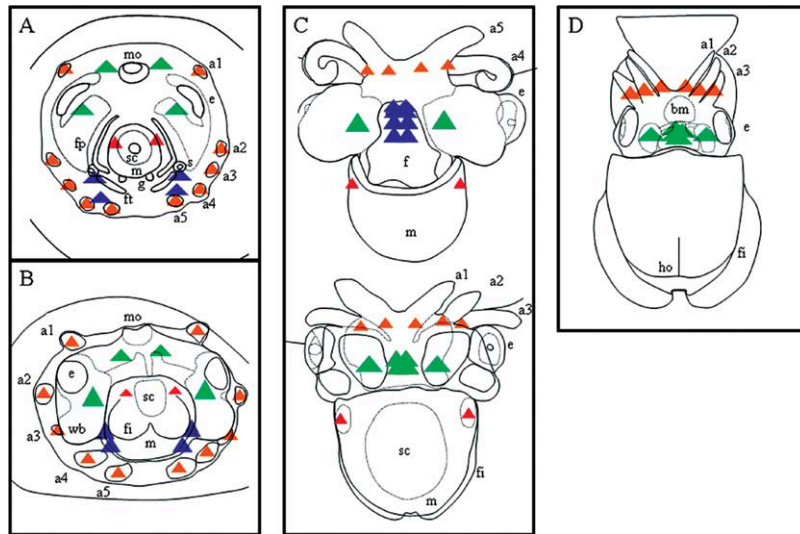
At stage 18, numerous NO positive cells are variously distributed on the embryo with a higher density in the dorsal anterior region between the two eyes around the future mouth (Fig. 2A). This region corresponds to presumptive cerebral ganglia. The mantle area is peripherally stained

(mantle edge) but not in its central part that corresponds to the shell sac depression primordia (shell sac edge + shell sac aperture) (Fig. 2B). Uni-

form distribution of NO positive cells is detectable in all prospective optic and white body areas (Fig. 2B). At this stage the arms appear to be

arranged as an arm crown: NO positive cells are detected at the basis between the arm buds V and IV corresponding to presumptive pedial ganglia (Fig. 2C). A slight positive signal is also observed above the statocysts in the region corresponding at this stage to the visceral ganglia (Fig. 2A–C). Staining was detectable neither in the brachial ganglia nor in the arm buds and the funnel prospective area, pouches and tube (Fig. 2C).

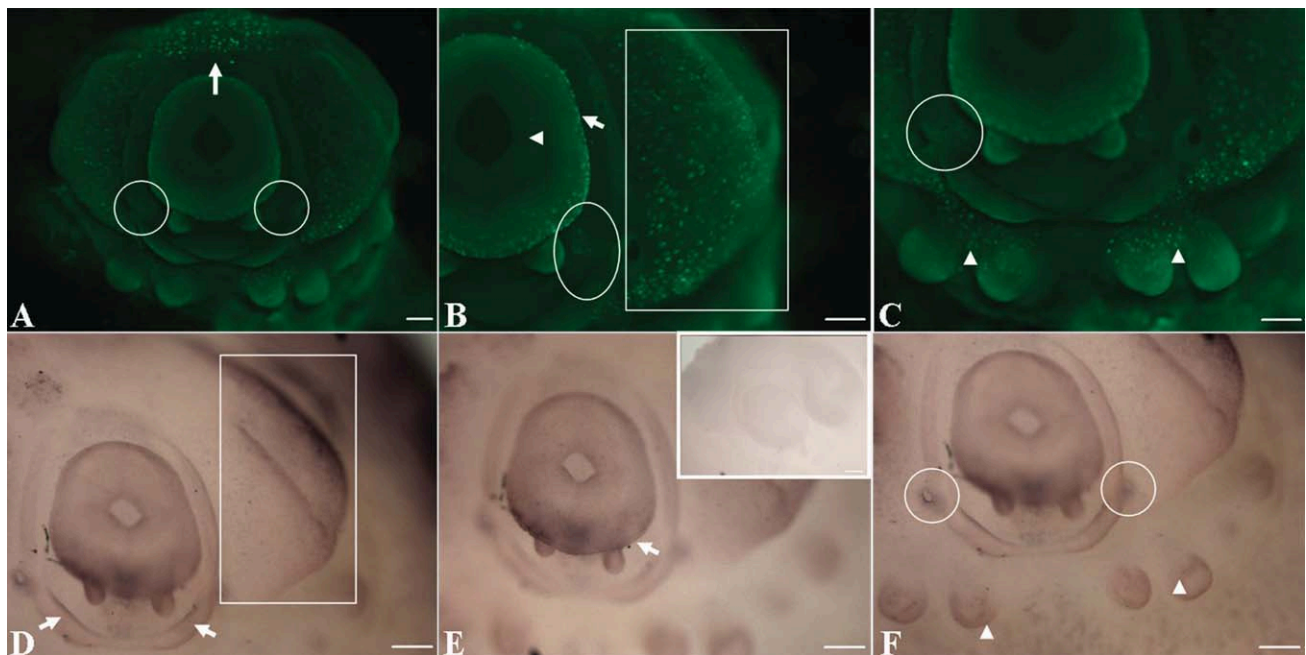
At stage 18 immunopositivity is detectable in prospective optic and white body areas, in funnel pouches (Fig. 2D). The staining is present along the periphery of the mantle (Fig. 2E), in the visceral ganglia and in the arm buds (Fig. 2F). NOS-like immunoreactivity has not been detected at stage 16.



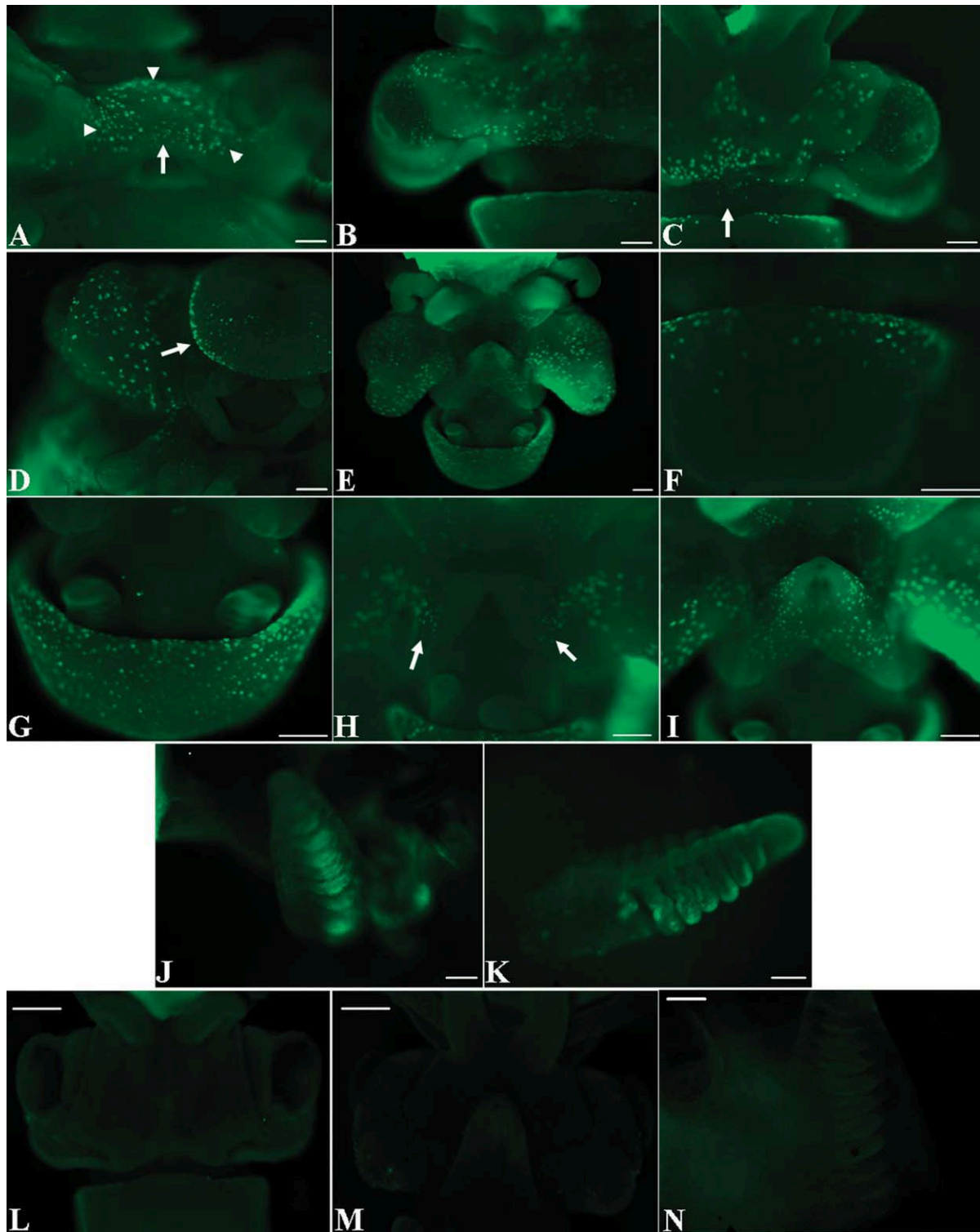
**Fig. 1.** Schematic representations of embryonic neural territories during *S. officinalis* organogenesis. **A:** Stage 18–19. **B:** Stage 21. **C:** Stage 24 up: ventral side, down: dorsal side. **D:** Stage 29–30. a, arm; bm, buccal mass; e, eye; f, funnel; fi, fin; ft, funnel tube; fp, funnel pouch; g, gill; ho, hoyle organ; m, mantle; mo, mouth; s, statocyste; sc, shell sac; wb, white body. Nervous system color triangles legends: peripheral nervous system (PNS): brachial ganglia (orange) and stellate ganglia (red). Central nervous system (CNS): optic ganglia (pale green) that differentiate into optic lobes from stage 21, cerebral ganglia (dark green); pedial ganglia (pale blue) and visceral ganglia (dark blue) that differentiate and condense into the suboesophageal mass of the brain.

### Stages 20–21–22–23

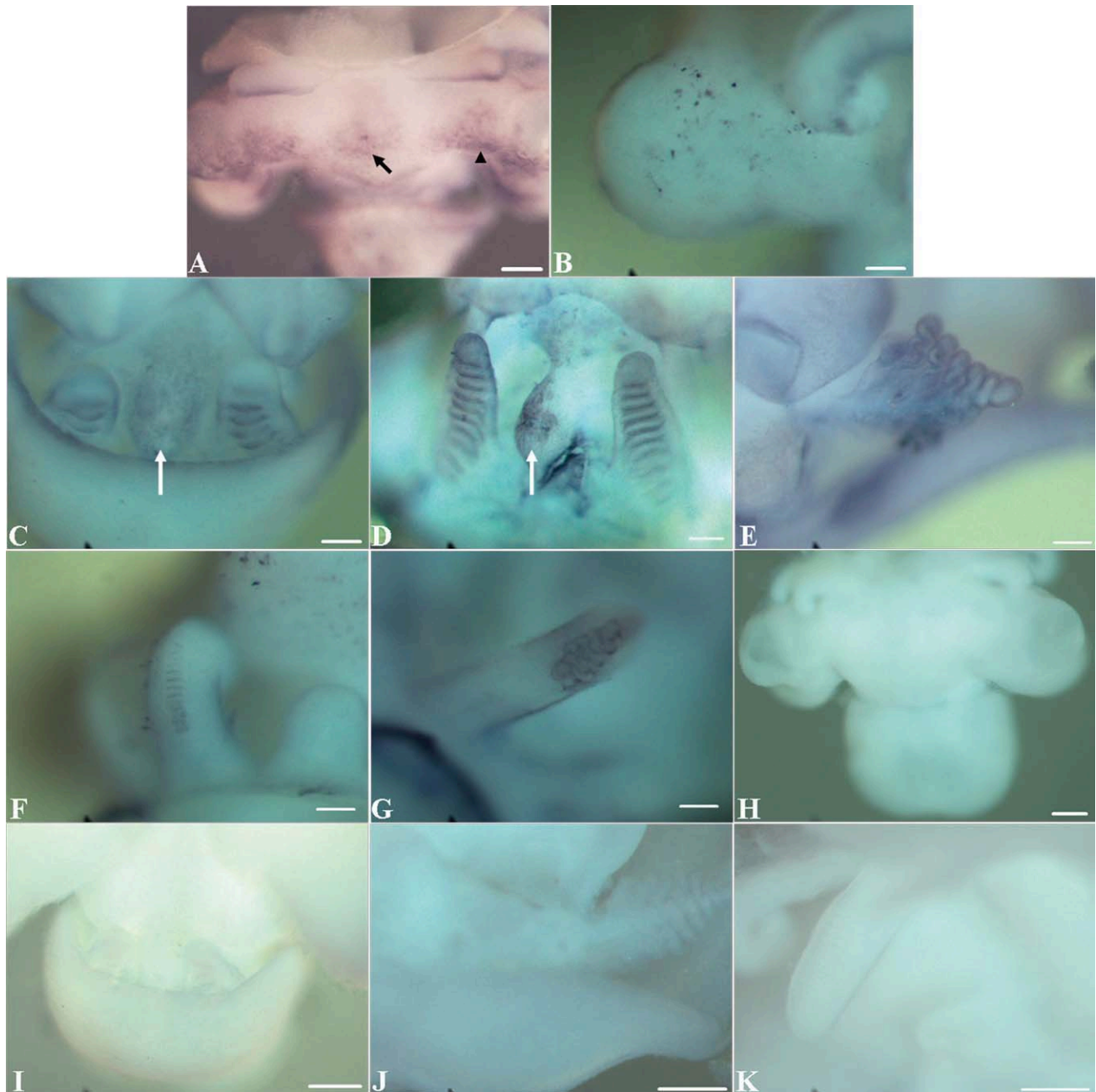
In the dorsal region, NO positive cells are observed in the mouth region in the area of cerebral ganglia (Fig. 1A) corresponding to future dorsal supraesophageal mass of the central nervous system (Fig. 3A, arrow) (Navet et al., 2009). Moreover, several



**Fig. 2.** Nitric oxide (NO) detection and NO synthase (NOS)-like immunoreactivity in *S. officinalis* embryo at stage 18. **A:** NO positive cells in the presumptive cerebral ganglia (arrow) and in the visceral ganglia (circle). **B:** NO positive cells in prospective optic and white body areas (square) and in the visceral ganglia (circle). Arrow: mantle edge. Arrowhead: shell sac depression primordia. **C:** NO positive cells in the visceral ganglia (circle) and in the presumptive pedial ganglia (arrowheads). **D:** Immunopositivity in prospective optic and white body areas (square) and in funnel pouches (arrows). **E:** Immunopositivity in the mantle edge (arrow). Insert: control. **F:** Immunopositivity in the visceral ganglia (circle) and in the arm buds (arrowheads). Scale bars = 200  $\mu$ m.



**Fig. 3.** Nitric oxide (NO) detection in *S. officinalis* organogenesis. **A:** NO positive cells in the area of cerebral ganglia (arrow) and in the epithelial cells (arrowheads) of the central region of the head, stage 20. **B:** NO positive cells extended toward the eyes, stage 22. **C:** Same signal extended toward the eyes. NO positive cells are visible in the nuchal region (arrow), stage 24. **D:** NO positive cells in the lateral edges of the mantle (arrow) and in the optic region of the head, stage 20. **E:** NO positive cells in the ventral head, stage 22. **F:** NO positive cells in the lateral edges of the dorsal mantle, stage 21. **G:** NO positive cells in the ventral mantle and in the gill lamellae, stage 22. **H:** NO Positive cells at the basis of the two elements of the funnel (arrows), stage 21. **I:** NO positive cells in all the funnel surface until the aperture except on the median part, stage 22. **J:** NO positive gill transverse folds, stage 22. **K:** NO positive gill lamellae, stage 24. **L-N:** Control experiments, stage 25 (L) dorsal view; (M) ventral view; (N) gills. Scale bars = 200  $\mu\text{m}$  in A-I, J, K, N, 500  $\mu\text{m}$  in L, M.



**Fig. 4.** Nitric oxide synthase (NOS)-like immunoreactivity in *S. officinalis* organogenesis. **A:** Immunopositivity at level of the central region of the head (arrow) and posteriorly to eyes (arrowhead), stage 20. **B:** Immunopositivity in the optic region, stage 20. **C,D:** Immunopositivity in the central region between the gills (arrows) and in gill transverse folds, stage 22. **E:** Immunopositivity in the gill lamellae, stage 24. **F:** Immunopositive arm proximal suckers, stage 20. **G:** Immunopositive suckers of tentacular club, stage 23. **H–K:** Control experiments: dorsal view, stage 25 (H); ventral mantle, stage 23 (I); gill, stage 24 (J); arm suckers, stage 24 (K). Scale bars = 500  $\mu\text{m}$  in H, 200  $\mu\text{m}$  in A,C,I–K, 100  $\mu\text{m}$  in B,D–G.

positive epithelial cells can be detected in this region (Fig. 3A, arrowheads). Positive cells are also located in the posterior part of the optic region (Fig. 3D). From stage 22, the NO fluorescence is localized only in epithelial cells whose distribution is extended toward the eyes (Fig. 3B) until covering totally the eyes at stage 24 (Fig. 3C). Moreover, NO signal is

localized in the nuchal region in which cephalic aorta branches (Fig. 3C). The ventral part of the head shows numerous NO positive cells from stage 20 to 22 (Fig. 3D,E).

In the mantle, NO positive cells are distributed peripherally with higher density in the lateral edges (Fig. 3D). In the dorsal side positive cells are distributed in each lateral part and

are absent in the median central region as well as in the posterior region (Fig. 3F). At stage 22, numerous positive cells appear in the ventral part of the mantle (Fig. 3G), not in the dorsal one where the positive cells remain located on the anterior edges as in the stage 21 (Fig. 3F). The funnel tube folds and the gills do not present any NO positive cells at stage

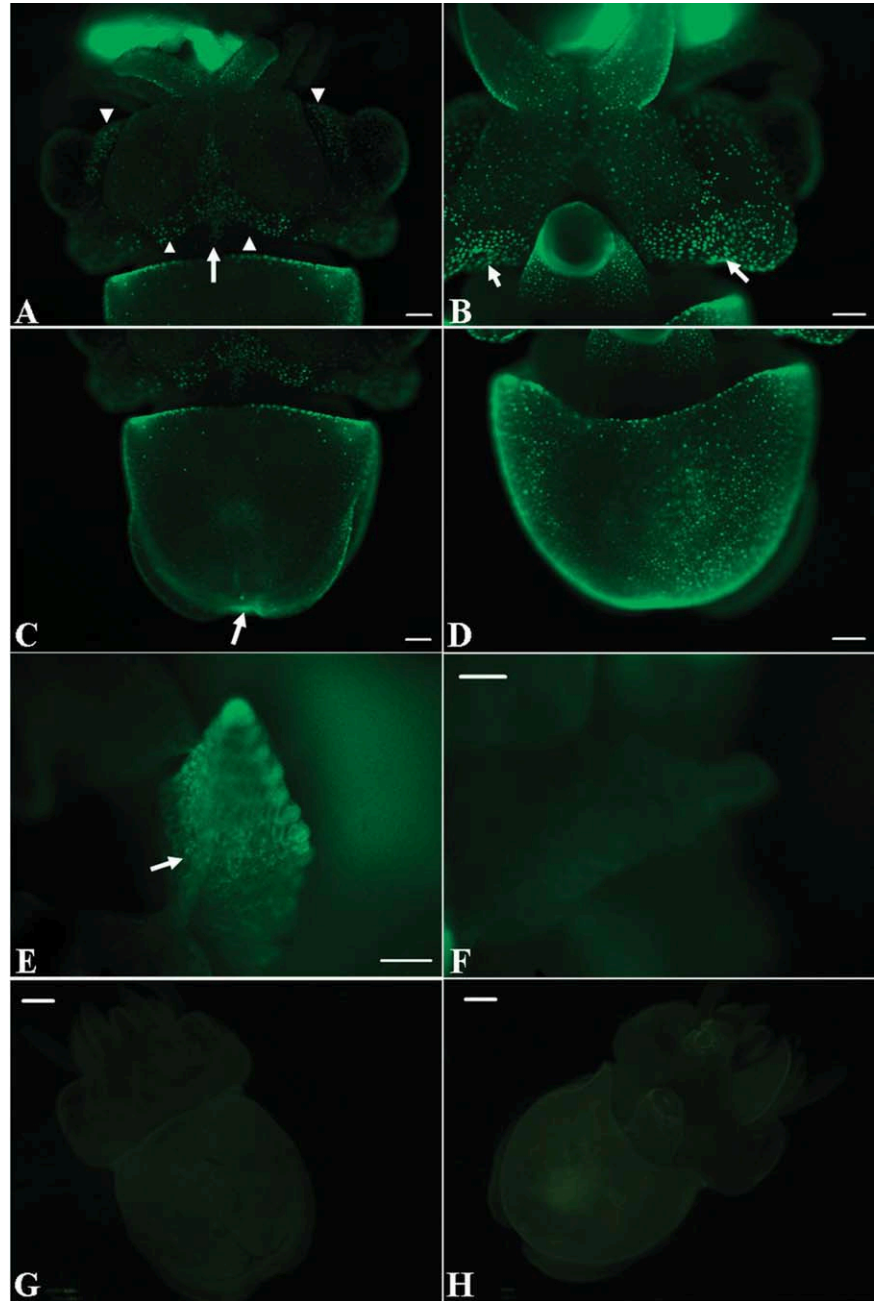


20 (Fig. 3D). At stage 21, the two elements of the funnel show each at their basis group of NO positive cells; no staining is visible at the anterior extremities in which the folds connect later to close the tube (Fig. 3H). Ventrally, at stage 22, when the funnel tube is formed (by the fusion at its internal face of the two folds), NO positive cells are present and extend in all funnel surface until the aperture except on the median ventral part of the funnel (Fig. 3I). In the gills from stage 22 (Fig. 3G,J), transverse folds corresponding to the delineating of the lamellae appear NO positive; fluorescence cannot be detected as restricted to the cells. At stage 24 NO is localized in the lamellae (Fig. 3K). After treatment with NOS inhibitor L-NAME, NO detection is abolished (Fig. 3L–N).

At stages 20 and 21 NOS immunopositivity is detectable at level of the central region of the head and posteriorly to eyes (Fig. 4A) and optic region (Fig. 4B) resembling the results of NO detection. The immunopositivity in the gills at stages 22 and 24 respectively in the transverse folds (Fig. 4C,D) and in the lamellae (Fig. 4E) overlaps the NO signal. Moreover an intense NOS immunopositivity is distributed in the region between the gills (Fig. 4C,D). In the arms at stage 20, immunopositivity is observed in the proximal suckers not yet differentiated (Fig. 4F), whereas no NO positive suckers have been evidenced in the stages 20 to 23. At stage 23, some of the suckers of the tentacular club, all differentiated, are immunopositive (Fig. 4G) but NO production has been evidenced only at later stages on proximal suckers (stage 27, Fig. 7K). No detectable signal was observed in control experiments with primary antibody omission (Fig. 4H–K).

### Stage 26

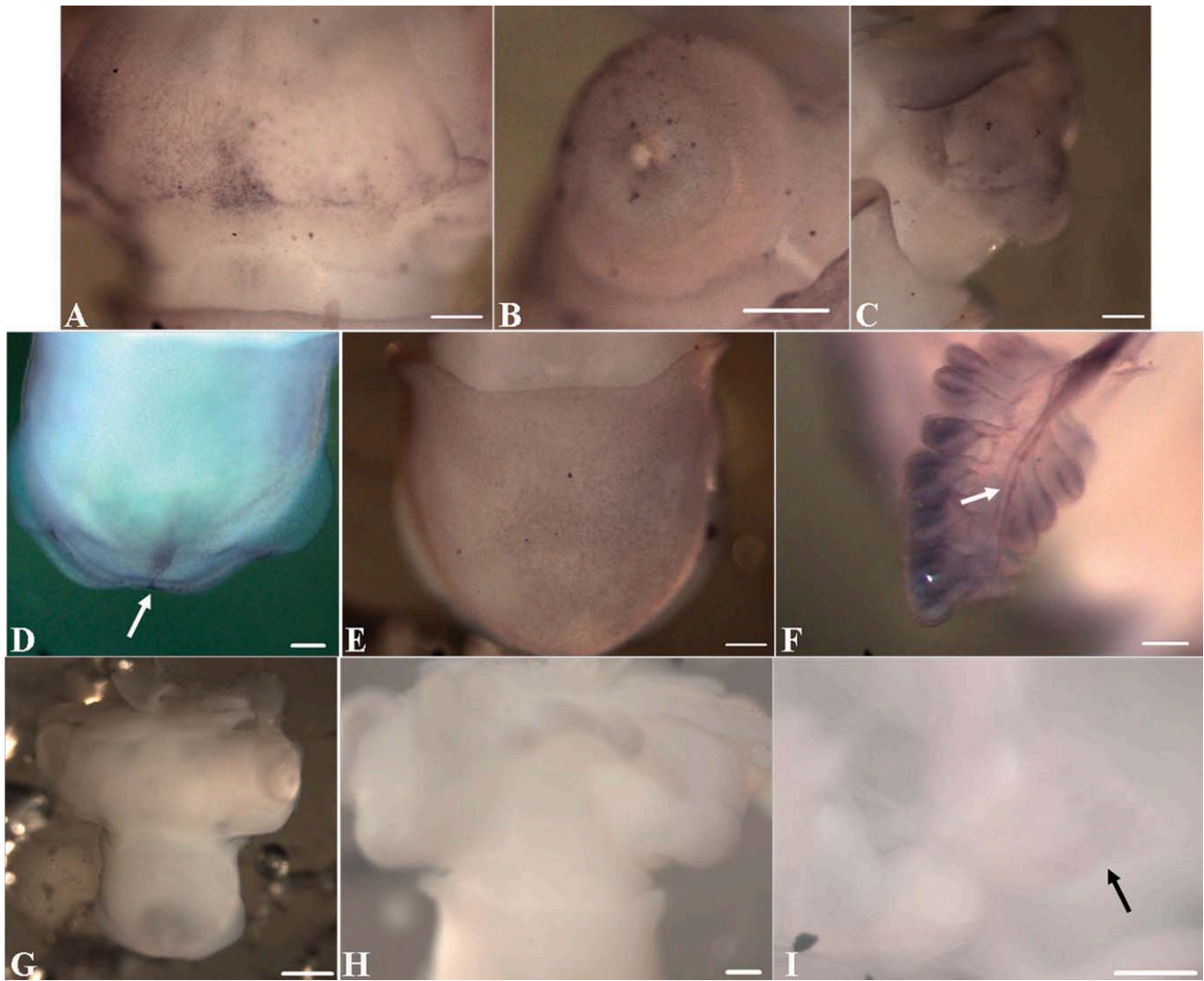
At stage 26 NO positive cells are variously distributed on the embryo in both dorsal and ventral side. On the head, there are two different NO positive epithelial cell populations. Indeed, on the dorsal side large NO positive cells are located in a triangular area at the centre of the head and in the lateral region bordering the eyes. Small NO positive cells are evidenced on the remaining part of the



**Fig. 5.** Nitric oxide (NO) detection in *S. officinalis* embryo at stage 26. **A:** Large NO positive cells located in a triangular area at the centre of the head and in the lateral region bordering the eyes (arrowheads). Small NO positive cells on the remaining part of the head, eyes and the external side of the arms. NO positive cells in the nuchal region (arrow). **B:** Large NO positive cells in two restricted bands (strips) on the ventral head (arrows). **C:** NO positive cells in the lateral edges of the dorsal mantle and in the Hoyle organ (arrow). **D:** NO positive cells in the ventral mantle. **E:** NO positive gill lamellae and afferent vessel (arrow). **F–H:** Control experiments, stage 27 (F), gill; (G), dorsal view; (H), ventral view. Scale bars = 500  $\mu\text{m}$  in A,C,G,H; 200  $\mu\text{m}$  in B,D–F.

head, on the eyes and the external side of the arms (Fig. 5A). Moreover, NO signal is localized in the nuchal region in which cephalic aorta branches (Fig. 5A). On the ventral side of the head, large positive cells

are located in two restricted bands (strips) on the posterior region except in the central part behind the funnel (Fig. 5B). The funnel continues to show NO positive cells equally distributed except in the median part as



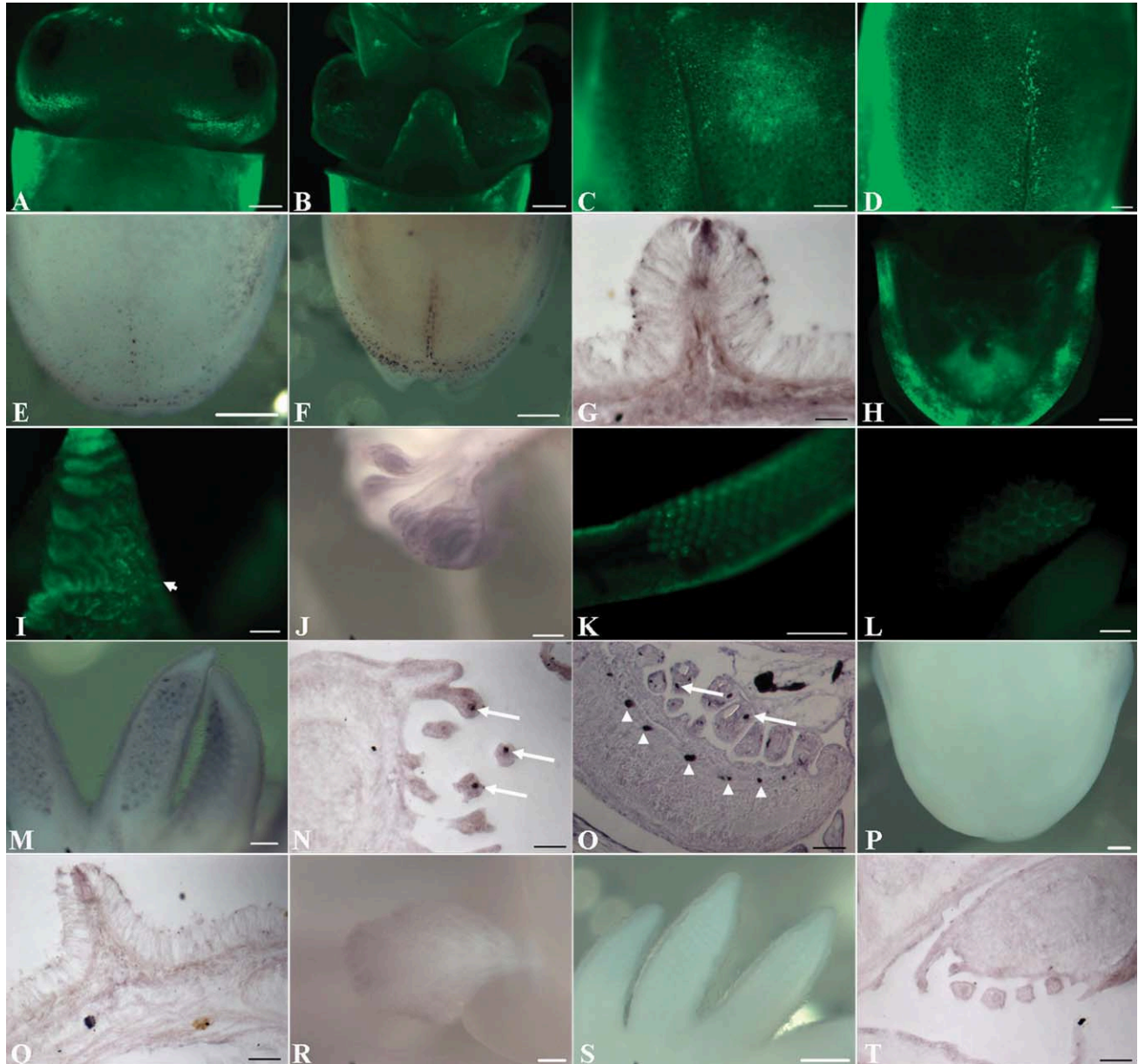
**Fig. 6.** Nitric oxide synthase (NOS)-like immunoreactivity in *S. officinalis* embryo at stage 26. **A:** Immunopositivity in a triangular area at the centre of the dorsal head. **B:** Immunopositivity on the eye. **C:** Immunopositivity on the ventral head. **D:** A weak immunopositivity in the Hoyle organ (arrow). **E:** Immunopositivity in the ventral mantle. **F:** Immunopositivity in gill lamellae and afferent vessel (arrow). **G–I:** Control experiments. **G,** dorsal view; **H,** ventral view; **I,** gill (arrow). Scale bars = 500  $\mu\text{m}$  in **G**; 200  $\mu\text{m}$  in **A–E, H, I**; 100  $\mu\text{m}$  in **F**.

in the previous stages (Fig. 5B). The dorsal and ventral parts of the mantle show different densities: the NO positive cells are located only at apical and lateral edge of the dorsal mantle, similar to the stage 24, whereas numerous NO-positive cells are distributed in overall ventral mantle (Fig. 5C,D). Moreover, on the dorsal mantle a weak signal begins to appear in the Hoyle organ (Fig. 5C). In the gills the fluorescent signal persists in the more differentiated lamellae and also appears in the afferent vessels as punctuated signal (Fig. 5E). Treatment of embryos with NO scavenger [2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide] (c-PTIO) abolishes NO detection (Fig.

5F–H). In the dorsal head NOS-like immunopositivity resembles the NO pattern, being localized, as strong signal, in a triangular area at the centre of the head and, as a more disperse signal, in the remaining part of the head and eyes (Fig. 6A,B). Immunopositivity is localized in the ventral head at level of optic region and in the arms and funnel (Fig. 6C). On the dorsal mantle a weak immunopositive signal in the Hoyle organ closely resembles the NO fluorescence (Fig. 6D). NOS-like immunopositivity on the ventral mantle and gill overlap the NO pattern (Fig. 6E,F). Control experiments performed in the absence of primary antibody show no signal (Fig. 6G–I).

### Stages 27–28–29

NO production appears more regionalized in the superficial cells in the late embryonic phase, in which the embryo has already reached the final adult conformation, than in the early developmental phases. In the dorsal side of head, at stages 27, 28 and 29, the positive cells become localized in two specific regions situated in a posterior area of the eyes and extend toward the junction between head and mantle (Fig. 7A). These cells could be epidermal cells as they are superficial and numerous. The median part does not show any positive cells. On the ventral side the large positive cells observed in the posterior part at stage



**Fig. 7.** Nitric oxide (NO) detection and NO synthase (NOS)-like immunoreactivity at late embryonic stages of *S. officinalis*. **A:** NO positive cells in the dorsal head, stage 28. **B:** NO positive cells in the ventral head, stage 28. **C:** NO positive cells in the Hoyle organ, stage 28. **D:** NO positive cells in the Hoyle organ, stage 29. **E:** Immunopositivity in the Hoyle organ, stage 28. **F:** Immunopositivity in the Hoyle organ, stage 29. **G:** Immunopositivity in the Hoyle organ section, stage 28. **H:** NO positive cells in the ventral mantle. Autofluorescence in the digestive bag, stage 28. **I:** NO positive gill lamellae and afferent vessel (arrow), stage 28. **J:** Immunopositive gill lamellae, stage 29. **K:** NO positive proximal suckers of the tentacular club, stage 27. **L:** NO positive distal suckers of the arms, stage 28. **M:** Immunopositive arm suckers, stage 27. **N:** Immunopositive arm suckers on sections (arrows), stage 27. **O:** Immunopositivity on sections in the suckers of the tentacular club (arrows) and in the nervous projections (arrowhead), stage 28. **P–T:** Control experiments. **P,** Hoyle organ; **Q,** Hoyle organ section; **R,** gill; **S,** arm suckers; **T,** arm suckers section. Scale bars = 500  $\mu\text{m}$  in A,B,E,F,H; 200  $\mu\text{m}$  in C,D,K,P,R,S; 100  $\mu\text{m}$  in I,J,L,M,O; 50  $\mu\text{m}$  in G,N,Q,T.

26 (see Fig. 5B) do not produce any more NO, whereas more NO producing cells, probably epidermal ones, appear in the anterior region (Fig. 7B). In the posterior region, in the Hoyle organ some specific NO positive cells are distributed with a higher density in the distal part of the midline at stage 28 (Fig. 7C). The number

of cells producing NO extends toward anterior region along the median line at stage 29 (Fig. 7D). The NO production is supported by immunostaining results on whole-mount and on sections (Fig. 7E–G). NOS is evidenced in the same mantle area in the Hoyle organ, both in the median line and laterally following the typical anchor

shape of the organ. The density of the immunopositive cells increases from stage 28 to 29 (Fig. 7E,F). In the ventral side of the mantle NO fluorescence begins to decrease in the central part and becomes restricted on the peripheral strip (Fig. 7H). A low internal signal observed in the digestive bag (Fig. 7H) is attributable to

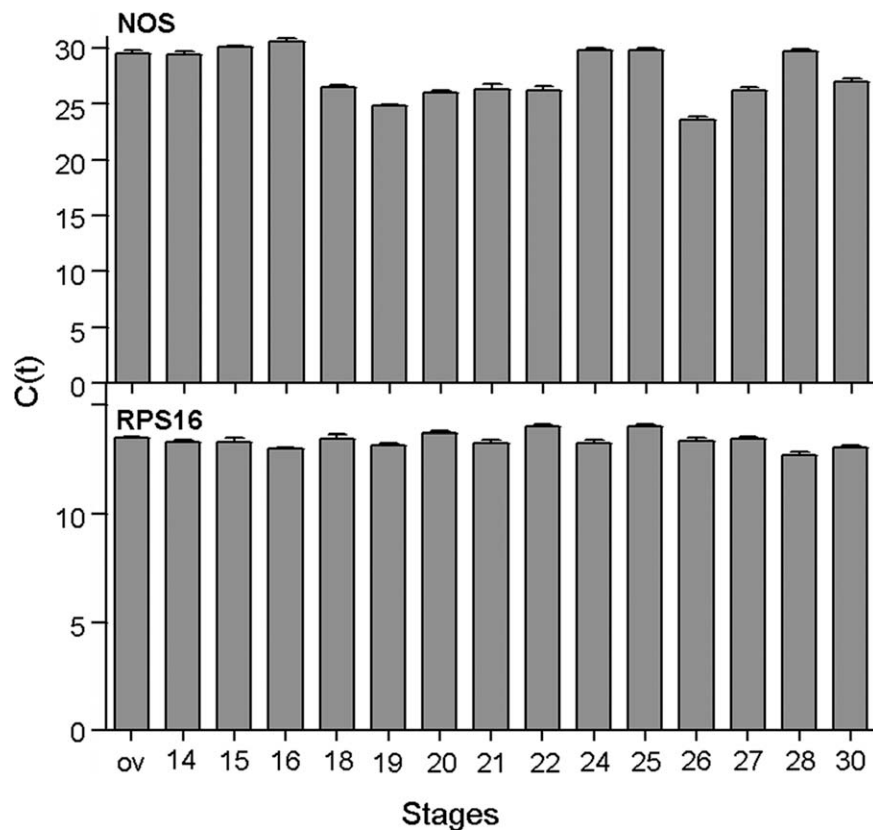
autofluorescence as shown in control experiments. In the gills, the NO signal as well as NOS-like immunopositivity, persist in lamellae and afferent vessel (Fig. 7I,J). The proximal suckers of the tentacular club and the distal suckers of the arms show NO production (Fig. 7K,L). These signals are supported by immunostaining in the suckers of arms on whole-mount (Fig. 7M) and section (Fig. 7N) as well as tentacular club section (Fig. 7O). In this latter, in addition to the signal in the suckers, immunopositivity is also detectable at level of nervous projections. No detectable signal was observed in control experiments with primary antibody omission (Fig. 7P–T).

### NOS Expression During *S. officinalis* Development

Temporal expression of *NOS* during development was followed by real-time PCR (ovocyte, stages 14–30) using primers located downstream the 18 nucleotides insert and which amplify both *SoNOSa* and *SoNOSb*, the two splicing forms identified in the adult (Scheinker et al., 2005). *NOS* expression significantly changes during development compared with that of 16S ribosomal RNA gene (*RPS16*), whose expression remains constant in all the stages examined. In particular, *NOS* expression increases from stages 18 to 22 and then reaches a maximum level of expression at stage 26, as reflected by the decrease of Ct values at these stages (Fig. 8).

### DISCUSSION

The results of this study show for the first time that NO is endogenously synthesized in all developmental stages of *S. officinalis* embryos, as revealed by NO and NOS enzyme detection as well as by monitoring *NOS* expression levels after real-time PCR. NO production is very localized and restricted to some regions even if in the apparently same tissues. This production is transitory and is mainly correlated to the presence of NOS, the enzyme responsible of gas formation. In the early stages of organogenesis (stage 18) the pattern of endogenous NO localization overlaps that of NOS distribution in the peripheral mantle,



**Fig. 8.** Temporal expression of *NOS* and *RPS16* during *S. officinalis* development. mRNA levels were measured by real-time polymerase chain reaction from cDNA templates prepared from ovocytes (ov) and embryos at the indicated developmental stages. Data in histograms are reported as mean  $\pm$  SD.

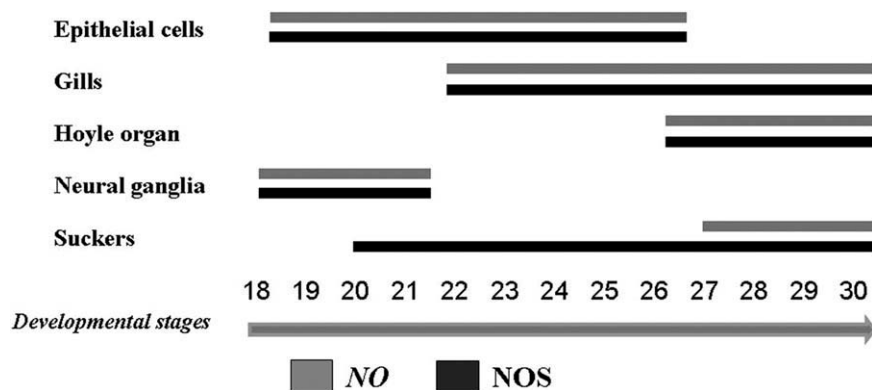
prospective optic and white body areas and in specific arms. At subsequent stages (20–21 and 26) this correspondence is maintained in different regions of the head (the central region of the head, and subsequently in the dorsal triangular area at the centre of the head, in the lateral region bordering the eyes and on the eyes). Also in the gills and Hoyle organ NO fluorescence and NOS immunostaining overlap during development. At stage 27 both NO and NOS are present in the suckers of the tentacles and arms. On the contrary, there is no correspondence between the two stainings in the arms and tentacles at least at stages 20/23 (Fig. 9). Indeed, although the arm suckers contain the protein NOS, they do not seem to produce the gas probably due to NOS regulation at posttranslational level. This process has been described to occur during the development of *Drosophila melanogaster* and *L. stagnalis* and has been attributed to the formation of inactive NOS het-

erodimers (Stasiv et al., 2001; Korneev and O'Shea, 2002). The enzyme accumulated during development may be used for a latter production of NO and further experiments will be necessary to address this aspect.

In *Sepia* embryos NO production appears to be very dynamic concerning different cells, different stages of cells of superficial tissues as well as internal tissues and organs (Fig. 9).

### Neural System

In *Sepia*, the nervous system is organized as the CNS (the brain) from sparse ganglia before hatching. NO is produced only in the first steps of *Sepia* embryo organogenesis (18–20) in almost all the ganglia area leading later to the CNS. This step corresponds to a crucial phase of differentiation as shown by Baratte and Bonnaud (2009). At the next stages (20 to 22) proliferation occurs, the ganglia grow and displace toward the anterior part of the animal, condense into a



**Fig. 9.** Schematic representation of nitric oxide (NO) and NO synthase (NOS) localization in different structures during *S. officinalis* development. There is overlapping between NO fluorescence and NOS immunostaining in epithelial cells, gills, Hoyle organ and neural ganglia in all developmental stages. In arm and tentacle suckers the correspondence between the two stainings is maintained in the stages 27–30 and it is not observed at stages 20–26.

brain and the connection takes place with functional differentiation of the lobes, from stages 24 to 30 (Fig. 1). Our finding that when the ganglia have begun to migrate (stage 21) do not produce anymore NO led us to suggest that the gas does not seem to have a role in proliferation of nervous cells but rather in sensorial superficial cells. On this basis, the developmental window where NO might act is very narrow, it is restricted to the first step of neural differentiation. This finding is in line with the differentiation role of NO in several neural in vitro and in vivo models (Contestabile and Ciani, 2004). Considering late stage, the involvement of NO in peripheral nervous system may be inferred by NOS localization in the transversal section of the tentacle where suckers nervous projections are detected (Fig. 70).

### Ciliary/Sensory Cells

The dynamic pattern of NO localization in superficial tissues from stage 18 to 27 can be attributed to different type of cells. The NO positive cells in the head and mantle of embryos from stage 18 to 23 (Figs. 2B, 3E–G) correspond to ciliated cells with long hair (Arnold and Williams-Arnold, 1980; Boletzky, 1982). As development proceeds this correspondence is not so straightforward. At stage 26 some of the NO positive cells (Fig. 5A–D) appear to be deeper than the large ciliated cells and may correspond to sensory cells. Of interest, the ciliature

pattern in squid embryos is composed of both paddle elongated ciliated cells and ciliary bands, with very short hairs (Arnold and Williams-Arnold, 1980). These last have been described in *Sepia* embryo only in the region of the Hoyle organ and in late developmental stages. These differences between *Sepia* and *Loligo* embryos are probably due to (1) a different hatching process because of the envelopes more difficult to cross for squids (2) a different lifestyle of sepia and squid juveniles, being the first benthic and the second planktonic (Boletzky, 1982). Regarding ciliary cells, it seems that NO production is evidenced in long ciliary cells, not in short ciliary bands near the Hoyle organ. The presence of NO could be related to the cilia beating in close analogy with the reported finding that NO regulates the ciliary beating in *Helisoma trivolvis* embryos (Cole et al., 2002) as well as in mammalian cells (Uzlaner and Priel, 1999; Li et al., 2000). In *Sepia* as for squid, the ciliary beating is a process essential for the fluid circulation inside the chorion, preventing accumulation of excretory products and facilitating respiratory exchange (Arnold and Williams-Arnold, 1980; Fioroni, 1990). Moreover, this process also contributes to hatching.

In the case of sensory cells, the finding that the production of NO is maintained during all development, with a larger distribution in the first stage, led us to hypothesize a role of NO in differentiation and maintaining these cells as essential for the perception of

environment after hatching. At later stages (28–29) the NO positive cells appear localized in the Hoyle organ. This organ consists of two different types of cells. The  $\alpha$  cells that function as adhesive cells and  $\delta$  cells containing lytic enzymes necessary to digest the chorion (Fioroni, 1990; Budelmann et al., 1997). The presence of NOS in the anchor shape organ may be related to the chemical process occurring at hatching.

### Gills

Both NO and NOS have been detected in the gills at different developmental stages: in the early stages (22–24) when differentiation processes occur in lamellae and in vascular system connection, and in subsequent stages (26–28) when the gills take over the respiration. In cephalopods the gills actively participate in osmoregulation and urine production (Schipp and Boletzky, 1975). In this regard, the presence of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase has been reported in the internal transport-active epithelium of the gills in *S. officinalis* (Hu et al., 2010; Donaubaer, 1981). The functioning of this pump in late embryos is of great importance in regulating acid-base disturbances due to high  $\text{pCO}_2$  and low pH values detected inside the egg capsule as hatching approaches (Gutowska and Melzner, 2009; Gutowska et al., 2010). Considering that NO has been reported to affect  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity in the Atlantic salmon (Ebbesson et al., 2005), a possibility remains that in *Sepia* NO may act on this pump and further colocalization studies will be necessary to prove this hypothesis. Moreover, the presence of NO and NOS in differentiating gills as well as in afferent vessels suggests the possible involvement of the gas in important processes, including morphogenesis and blood circulation. This latter hypothesis is congruent with the vasodilatory role of NO in adult *Sepia* (Schipp and Gebauer, 1999).

Overall these studies represent the first detailed description of NO and NOS pattern during cephalopod development, revealing that NO is produced in different structures characterized by specific functions. The

results provide the basis for future functional studies directed to increase our knowledge of this new developmental model system.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Embryo Collection

All animal procedures were in compliance with the guidelines of the European Union (directive 86/609) and additional procedures for cephalopods recommended in Boyle (Boyle, 1991). Fertilized eggs were laid by *S. officinalis* females after mating with adult males in the tanks of the service marine resources at the Zoological Station. The eggs were allowed to develop in oxygenated sea water (SW) at 20°C. The embryos are protected by several black envelopes surrounding the chorion. They constitute an interface with the environment the exchanges being limited. Three phases of organogenesis are determined: a disk shaped stage (stages 14 to 19), an expansion stage (stages 20 to 22) and a straightening up stage (22–29). Before the beginning of organogenesis, the chorion is linked to the embryo. As the embryo grows, the chorion separates and the space progressively fills with perivitelline fluid. Until hatching the fluid increases probably by ion and water exchanges with environment and the envelopes become thin. From eggs batches, individual eggs were detached and embryos were collected after removing the numerous surrounding envelopes. Embryos belonging to different stages were selected according to the developmental landmarks established by Lemaire (1970) and were examined for NO detection, immunohistochemistry and real-time PCR.

### Chemicals

Nitro blue tetrazolium (NBT) and 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) were obtained from Roche Diagnostics S.p.A. (Monza, Italy). 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM-DA) (10 mM stock in DMSO) from Molecular Probes was purchased from Invitrogen (S. Giuliano Milanese, Italy). [2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3oxide] (c-PTIO) (10 mM stock in SW)

and biotinylated anti-rabbit IgG, VECTASTAIN ABC-AP kit were obtained from Vinci-Biochem (Vinci, Italy).

### NO Detection

NO localization was performed starting from stage 18 to 29 using DAF-FM-DA. In previous stages, the chorion is tightly attached to the embryo and its removal causes embryo damage and hampers subsequent NO detection. The samples were incubated in the dark with 12.5  $\mu$ M DAF-FM-DA in filtered SW for 20 min for dye loading. Subsequently, they were washed and incubated in SW for 30 min to allow complete de-esterification of diacetates. Fluorescence was visualized with a Leica stereo-microscope equipped with a digital camera Leica DFC 490 and GFP filters. Images were acquired with Leica application suite software. In control experiments embryos were incubated in sea water in the absence or presence of the NO scavenger 1 mM c-PTIO or the NOS inhibitor 10 mM L-NAME before exposure to the NO indicator DAF-FM-DA. After 5 hr the embryos were safely and fluorescence was detected as described above. At least three embryos at each stage were used for both control and reaction.

### Immunohistochemistry

Whole-mount immunohistochemistry was performed on *Sepia* embryos from stage 16 to 29. Starting from stage 20, the chorion has been removed and the embryos were fixed for 1 hr in 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M MOPS pH 7.5, 0.5 M NaCl at room temperature. Previous stages were prefixed with chorion in the same PFA solution and then, after chorion removal, the embryos were fixed for other 45 min. After washing in SW for 1 hr, the embryos were post-fixed in 20% acetic acid, 0.1% Tween 20 in PBS for 1 hr and then washed in 0.1% Tween 20 in PBS for 1 hr. Embryos were then permeabilized in 0.2% Triton X-100 in PBS for 45 min. Nonspecific binding was blocked by incubating the embryos in blocking buffer: 20% normal goat serum (NGS) in 0.2% Triton-X 100, 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS overnight

at 4°C. As primary antibody, rabbit polyclonal anti-universal NOS (Pierce-ABR, Euroclone, Pero, Milan, Italy), generated to a peptide of a conserved C-terminal region present in all known animal NOS, was used. Incubation with primary antibody at a dilution of 1:500 was carried out in 0.2% Triton-X 100, 1% BSA in PBS overnight at 4°C. After washings in 0.1% Triton-X 100 in PBS for 2 hr, embryos were incubated with secondary antibody, biotinylated anti-rabbit IgG (1:2,500) in 0.1% Triton-X 100 in PBS for 2 hr at 4°C. Embryos were then washed in 0.1% Triton-X 100 in PBS for 2 hr. Staining was performed using VECTASTAIN ABC-AP Reagent (Avidin DH and biotinylated alkaline phosphatase H) and visualized by a Leica stereo-microscope equipped with a digital camera Leica DFC 490. The images were acquired using Leica application suite software. The same protocol was used for the control experiments but with omission of the primary antibody.

For immunohistochemistry on sections, fixed embryos at stages 27/28 were included in OCT. Dry cryostat sections (20  $\mu$ m) collected on superfrost slides were washed in 0.1% Tween 20 in PBS for 30 min. Slides were incubated in the blocking solution 5% NGS in PBS for 1 hr and then incubated with rabbit polyclonal anti-universal NOS at a dilution of 1:10,000 in 1% BSA in PBS overnight at 4°C. After washings in PBS for 1 hr, sections were incubated with biotinylated secondary antibody 1:20,000 in PBS for 45 min. Sections were then washed with PBS for 30 min. Staining was performed using VECTASTAIN ABC-AP Reagent and visualized with a Zeiss AxioImager M1 microscope. At least three embryos at each stage were used for both control and reaction.

### RNA Extraction and cDNA Synthesis

Each dechorionated developmental stage was collected, frozen in liquid nitrogen and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Total RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. After addition of chloroform/isoamyl alcohol (24:1) (0.2 ml/ml TRIzol) and subsequent

centrifugation at 12,000 rpm for 15 min, RNA was precipitated in the presence of glycogen and isopropyl alcohol. Contaminating DNA was degraded by treating each sample with DNase RNase-free kit (Roche) according to manufacturer's instructions. The quantity and purity of total extracted RNA was estimated monitoring both the absorbance at 260 nm and ratios 260/280 and 260/230 nm by Nanodrop (ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer; NanoDrop Technologies). The quality of RNA was evaluated by gel electrophoresis. Intact rRNA subunits (28S and 18S) were observed on the gel indicating minimal degradation of the RNA.

For each sample 600 ng of total RNA was retrotranscribed with iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad) following the manufacturer's instructions. cDNA was diluted 1:2 with H<sub>2</sub>O before the use in real-time PCR experiments.

### Real-time PCR

Specific primer sets for each gene were designed on the basis of sequences of 16S ribosomal RNA gene (*RPS16*) and *NOS* gene, available on NCBI website. The following primers were used: *NOS* forward (F9), 5'-GAAAGGCTGGGGC-AGCATGAC-3'; *NOS* reverse (R6), 5'-A-ATCATCTCGACGGTGTTCAGA-3'; *RPS16* forward, 5'-GGTTTGACGAAGGTTTACCTG-3'; *RPS16* reverse, 5'-CGCTGTTATCCCTATGGTAAC-3'. A fragment of 150 bp was amplified for *RPS16* gene, a fragment of 207 bp for *NOS* gene.

Specificity of every amplification reaction was verified by melting curve analysis. The efficiency of each primer pair was calculated according to standard methods curves using the equation  $E=10^{-1/\text{slope}}$ . Five serial dilutions were set up to determine Ct values and reaction efficiencies for all primer pairs. Standard curves were generated for each oligonucleotide pairs using the Ct values versus the logarithm of each dilution factor. PCR efficiencies were calculated for *RPS16* and *NOS* genes and were found to be 2. Diluted cDNA was used as template in a reaction containing a final concentration of 0.3  $\mu$ M for each primer and 1 $\times$  FastStart SYBR Green master mix (total volume of 25  $\mu$ l). PCR

amplifications were performed in a Chromo 4 Real Time Detector (Bio-rad) thermal cycler using the following thermal profile: 95°C for 10 min, one cycle for cDNA denaturation; 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min, 40 cycles for amplification; 72°C for 5 min, one cycle for final elongation; one cycle for melting curve analysis (from 60°C to 95°C) to verify the presence of a single product. Each assay included a no-template control for each primer pair. To capture intra-assay variability all RT-qPCR reactions were carried out in triplicate. Fluorescence was measured using Opticon Monitor 3.1 (Biorad). Relative expression ratios above two cycles were considered significant. Experiments were repeated at least twice. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Molecular Biology Service for real-time PCR experiments and for oligos synthesis, Alberto Macina, and the service "Marine Resources for Research" for assistance with living organisms. L.B. and A.A. were funded by an ASSEMBLE grant agreement and they thank the Stazione Zoologica Anton Dohrn for the facilities during their stay in Naples.

### REFERENCES

- Andreakis N, D'Aniello S, Albalat R, Patti FP, Garcia-Fernandez J, Procaccini G, Sordino P, Palumbo A. 2011. Evolution of the nitric oxide synthase family in metazoans. *Mol Biol Evol* 28:163–179.
- Arnold JM, Williams-Arnold LD. 1980. Development of the ciliature pattern on the embryo of the squid *Loligo Pealei*: a scanning electron microscope study. *Biol Bull* 159:102–116.
- Baratte S, Bonnaud L. 2009. Evidence of early nervous differentiation and early catecholaminergic sensory system during *Sepia officinalis* embryogenesis. *J Comp Neurol* 517:539–549.
- Baratte S, Andouche A, Bonnaud L. 2007. Engrailed in cephalopods: a key gene related to the emergence of morphological novelties. *Dev Genes Evol* 217:353–362.
- Bishop CD, Brandhorst BP. 2001. NO/cGMP signaling and HSP90 activity represses metamorphosis in the sea urchin *Lytechinus pictus*. *Biol Bull* 201:394–404.
- Bishop CD, Brandhorst BP. 2003. On nitric oxide signaling, metamorphosis,

and the evolution of biphasic life cycles. *Evol Dev* 5:542–550.

- Bishop CD, Brandhorst BP. 2007. Development of nitric oxide synthase-defined neurons in the sea urchin larval ciliary band and evidence for a chemosensory function during metamorphosis. *Dev Dyn* 236:1535–1546.
- Bishop CD, Bates WR, Brandhorst BP. 2001. Regulation of metamorphosis in ascidians involves NO/cGMP signaling and HSP90. *J Exp Zool* 289:374–384.
- Bishop CD, Pires A, Norby SW, Boudko D, Moroz LL, Hadfield MG. 2008. Analysis of nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling during metamorphosis of the nudibranch *Phestilla sibogae* Bergh (Gastropoda: Opisthobranchia). *Evol Dev* 10:288–299.
- Boletzky Sv. 1982. Structure tegumentaire de l'embryon et mode d'eclosion chez les Cephalopodes. *Bull Soc Zool Fr* 107:475–483.
- Boletzky Sv, Erlwein B, Hofmann DK. 2006. The *Sepia* egg: a showcase of cephalopod embryology. *Vie et milieu--Life and environment* 56:191–201.
- Boyle PR. 1991. The UFAW handbook on the care and management of cephalopods in the laboratory. Harlow: Longman.
- Bradley S, Tossell K, Lockley R, McDearmid JR. 2010. Nitric oxide synthase regulates morphogenesis of zebrafish spinal cord motoneurons. *J Neurosci* 30:16818–16831.
- Budelmann BU, Schipp R, Boletzky Sv. 1997. Cephalopoda. In: Harrison FW, Kohn AJ, editors. *Microscopic anatomy of invertebrates*. New York: Wiley-Liss. Volume 6A: Mollusca II, p 119–414.
- Colasanti M, Persichini T, Venturini G. 2010. Nitric oxide pathway in lower metazoans. *Nitric Oxide* 23:94–100.
- Cole AG, Mashkournia A, Parries SC, Goldberg JI. 2002. Regulation of early embryonic behavior by nitric oxide in the pond snail *Helisoma trivolvis*. *J Exp Biol* 205:3143–3152.
- Comes S, Locascio A, Silvestre F, d'Ischia M, Russo GL, Tosti E, Branno M, Palumbo A. 2007. Regulatory roles of nitric oxide during larval development and metamorphosis in *Ciona intestinalis*. *Dev Biol* 306:772–784.
- Contestabile A, Ciani E. 2004. Role of nitric oxide in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation. *Neurochem Int* 45:903–914.
- Di Cosmo A, Di Cristo C, Palumbo A, d'Ischia M, Messenger JB. 2000. Nitric oxide synthase (NOS) in the brain of the cephalopod *Sepia officinalis*. *J Comp Neurol* 428:411–427.
- Di Cristo C, Fiore G, Scheinker V, Enikolopov G, d'Ischia M, Palumbo A, Di Cosmo A. 2007. Nitric oxide synthase expression in the central nervous system of *Sepia officinalis*: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci* 26:1599–1610.
- Donaubauer HH. 1981. Sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase in the excretory organs of *Sepia officinalis* (Cephalopoda). *Mar Biol* 63:143–150.

- Ebbesson LO, Tipsmark CK, Holmqvist B, Nilsen T, Andersson E, Stefansson SO, Madsen SS. 2005. Nitric oxide synthase in the gill of Atlantic salmon: colocalization with and inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *J Exp Biol* 208:1011–1017.
- Fiore G, Poli A, Di Cosmo A, d'Ischia M, Palumbo A. 2004. Dopamine in the ink defence system of *Sepia officinalis*: biosynthesis, vesicular compartmentation in mature ink gland cells, nitric oxide (NO)/cGMP-induced depletion and fate in secreted ink. *Biochem J* 378:785–791.
- Fioroni P. 1990. Our recent knowledge of the development of the cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Zool Anz* 224:1–25.
- Froggett SJ, Leise EM. 1999. Metamorphosis in the marine snail *Ilyanassa obsoleta*, Yes or NO? *Biol Bull* 196:57–62.
- Grimaldi A, Tettamanti G, Acquati F, Bossi E, Guidali ML, Banfi S, Monti L, Valvassori R, de Eguileor M. 2008. A hedgehog homolog is involved in muscle formation and organization of *Sepia officinalis* (mollusca) mantle. *Dev Dyn* 237:659–671.
- Gutowska MA, Melzner F. 2009. Abiotic conditions in cephalopod (*Sepia officinalis*) eggs: embryonic development at low pH and high pCO<sub>2</sub>. *Mar Biol* 156:515–519.
- Gutowska MA, Melzner F, Langenbuch M, Bock C, Claireaux G, Pörtner HO. 2010. Acid-base regulatory ability of the cephalopod (*Sepia officinalis*) in response to environmental hypercapnia. *J Comp Physiol B* 180:323–335.
- Halm MP, Chichery MP, Chichery R. 2003. Effect of nitric oxide synthase inhibition on the manipulative behaviour of *Sepia officinalis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 134:139–146.
- Hens MD, Fowler KA, Leise EM. 2006. Induction of metamorphosis decreases nitric oxide synthase gene expression in larvae of the marine mollusc *Ilyanassa obsoleta* (say). *Biol Bull* 211:208–211.
- Hu MY, Sucre E, Charmantier-Daures M, Charmantier G, Lucassen M, Himmerkus N, Melzner F. 2010. Localization of ion-regulatory epithelia in embryos and hatchlings of two cephalopods. *Cell Tissue Res* 339:571–583.
- Hu MY, Tseng YC, Stump M, Gutowska MA, Kiko R, Lucassen M, Melzner F. 2011. Elevated seawater PCO<sub>2</sub> differentially affects branchial acid-base transporters over the course of development in the cephalopod *Sepia officinalis*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300:R1100–R1114.
- Korneev S, O'Shea M. 2002. Evolution of nitric oxide synthase regulatory genes by DNA inversion. *Mol Biol Evol* 19:1228–1233.
- Leckie C, Empson R, Becchetti A, Thomas J, Galione A, Whitaker M. 2003. The NO pathway acts late during the fertilization response in sea urchin eggs. *J Biol Chem* 278:12247–12254.
- Leise EM, Kempf SC, Durham NR, Gifondorwa DJ. 2004. Induction of metamorphosis in the marine gastropod *Ilyanassa obsoleta*: 5HT, NO and programmed cell death. *Acta Biol Hung* 55:293–300.
- Lemaire J. 1970. Table de developement embryonnaire de *Sepia Officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). *Bull Soc Zool France* 95:773–782.
- Li D, Shirakami G, Zhan X, Johns RA. 2000. Regulation of ciliary beat frequency by the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate signaling pathway in rat airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23:175–181.
- Mattiello T, Fiore G, Brown ER, d'Ischia M, Palumbo A. 2010. Nitric oxide mediates the glutamate-dependent pathway for neurotransmission in *Sepia officinalis* chromatophore organs. *J Biol Chem* 285:24154–24163.
- Mohri T, Sokabe M, Kyojuka K. 2008. Nitric oxide (NO) increase at fertilization in sea urchin eggs upregulates fertilization envelope hardening. *Dev Biol* 322:251–262.
- Naef A. 1928. Die Cephalopoden (Embryologie). *Fauna Flora Golf Napoli, monogr.* 35–2 [English translation available from Smithsonian Institution Libraries, Washington D.C., 20560, USA].
- Nave S, Bassaglia Y, Baratte S, Martin M, Bonnaud L. 2008. Somatic muscle development in *Sepia officinalis* (cephalopoda - mollusca): a new role for NK4. *Dev Dyn* 237:1944–1951.
- Nave S, Andouche A, Baratte S, Bonnaud L. 2009. Shh and Pax6 have unconventional expression patterns in embryonic morphogenesis in *Sepia officinalis* (Cephalopoda). *Gene Expr Patterns* 9:461–467.
- Palumbo A. 2005. Nitric oxide in marine invertebrates: a comparative perspective. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 142:241–248.
- Palumbo A, d'Ischia M. 2007. Nitric oxide biogenesis, signalling and roles in molluscs: the *Sepia officinalis* paradigm. In: Trimmer B, Tota B, editors. *Advances in experimental biology*. London: Elsevier. p 45–64.
- Palumbo A, Di Cosmo A, Poli A, Di Cristo C, d'Ischia M. 1999. A calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase, NMDAR2/3 receptor subunits, and glutamate in the CNS of the cuttlefish *Sepia officinalis*: localization in specific neural pathways controlling the inking system. *J Neurochem* 73:1254–1263.
- Palumbo A, Poli A, Di Cosmo A, d'Ischia M. 2000. N-Methyl-D-aspartate receptor stimulation activates tyrosinase and promotes melanin synthesis in the ink gland of the cuttlefish *Sepia officinalis* through the nitric oxide/cGMP signal transduction pathway. A novel possible role for glutamate as physiologic activator of melanogenesis. *J Biol Chem* 275:16885–16890.
- Paul DM, Vilas SP, Kumar JM. 2011. A flow-cytometry assisted segregation of responding and non-responding population of endothelial cells for enhanced detection of intracellular nitric oxide production. *Nitric Oxide* 25:31–40.
- Pechenik JA, Cochrane DE, Li W, West ET, Pires A, Leppo M. 2007. Nitric oxide inhibits metamorphosis in larvae of *Crepidula fornicata*, the slippershell snail. *Biol Bull* 213:160–171.
- Peunova N, Scheinker V, Ravi K, Enikolopov G. 2007. Nitric oxide coordinates cell proliferation and cell movements during early development of *Xenopus*. *Cell Cycle* 6:3132–3144.
- Romano G, Costantini M, Buttino I, Ianora A, Palumbo A. 2011. Nitric oxide mediates the stress response induced by diatom aldehydes in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *PLoS ONE* 6:e25980.
- Scheinker V, Fiore G, Di Cristo C, Di Cosmo A, d'Ischia M, Enikolopov G, Palumbo A. 2005. Nitric oxide synthase in the nervous system and ink gland of the cuttlefish *Sepia officinalis*: molecular cloning and expression. *Biochem Biophys Res Commun* 338:1204–1215.
- Schipp R, Boletzky Sv. 1975. Morphology and function of the excretory organs in dibranchiate cephalopods. *Fortschritt Zool* 23:89–111.
- Schipp R, Gebauer M. 1999. Nitric oxide: a vasodilatory mediator in the cephalic aorta of *Sepia officinalis* (L.) (Cephalopoda). *Invert Neurosci* 4:9–15.
- Serfözö Z, Elekes K. 2002. Nitric oxide level regulates the embryonic development of the pond snail *Lymnaea stagnalis*: pharmacological, behavioral, and ultrastructural studies. *Cell Tissue Res* 310:119–130.
- Stasiv Y, Regulski M, Kuzin B, Tully T, Enikolopov G. 2001. The Drosophila nitric-oxide synthase gene (dNOS) encodes a family of proteins that can modulate NOS activity by acting as dominant negative regulators. *J Biol Chem* 276:42241–42251.
- Thavaradhara K, Leise EM. 2001. Localization of nitric oxide synthase-like immunoreactivity in the developing nervous system of the snail *Ilyanassa obsoleta*. *J Neurocytol* 30:449–456.
- Tranguch S, Steuerwald N, Huet-Hudson YM. 2003. Nitric oxide synthase production and nitric oxide regulation of pre-implantation embryo development. *Biol Reprod* 68:1538–1544.
- Tu Y, Budelmann BU. 2000. Effects of nitric oxide donors on the afferent resting activity in the cephalopod statocyst. *Brain Res* 865:211–220.
- Uzlaner N, Priel Z. 1999. Interplay between the NO pathway and elevated [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> enhances ciliary activity in rabbit trachea. *J Physiol* 516:179–190.
- Welshhans K, Rehder V. 2007. Nitric oxide regulates growth cone filopodial dynamics via ryanodine receptor-mediated calcium release. *Eur J Neurosci* 26:1537–1547.
- Willmott N, Sethi JK, Walseth TF, Lee HC, White AM, Galione A. 1996. Nitric oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signaling pathway. *J Biol Chem* 271:3699–3705.



Article n°3

Bassaglia, Y., Bekel, T., Da Silva, C., Poulain, J., Andouche, A., Navet, S., & Bonnaud, L. (2012). ESTs library from embryonic stages reveals tubulin and reflectin diversity in *sepia officinalis* (mollusca - Cephalopoda). *Gene*, 498(2):203–211.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Gene

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/gene](http://www.elsevier.com/locate/gene)

## ESTs library from embryonic stages reveals tubulin and reflectin diversity in *Sepia officinalis* (Mollusca – Cephalopoda)

Yann Bassaglia<sup>a,d,\*</sup>, Thomas Bekel<sup>b</sup>, Corinne Da Silva<sup>c</sup>, Julie Poulain<sup>c</sup>, Aude Andouche<sup>a</sup>, Sandra Navet<sup>e</sup>, Laure Bonnaud<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup> Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), Département Milieux et Peuplements Aquatiques (DMPA), UMR Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), MNHN, CNRS 7208, IRD 207, UPMC, Paris, France

<sup>b</sup> CeBiTec/BRF, Universität Bielefeld, Bielefeld, Germany

<sup>c</sup> CEA, GENOSCOPE, Evry, France

<sup>d</sup> Université Paris Est Créteil-Val de Marne (UPEC), Faculté de sciences, Créteil, France

<sup>e</sup> Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Accepted 31 January 2012

Available online 16 February 2012

#### Keywords:

*Sepia officinalis*

Development

Expressed sequence tags (ESTs)

Tubulin

Reflectin

### ABSTRACT

New molecular resources regarding the so-called “non-standard models” in biology extend the present knowledge and are essential for molecular evolution and diversity studies (especially during the development) and evolutionary inferences about these zoological groups, or more practically for their fruitful management. *Sepia officinalis*, an economically important cephalopod species, is emerging as a new lophotrochozoan developmental model. We developed a large set of expressed sequence tags (ESTs) from embryonic stages of *S. officinalis*, yielding 19,780 non-redundant sequences (NRS). Around 75% of these sequences have no homologs in existing available databases. This set is the first developmental ESTs library in cephalopods. By exploring these NRS for tubulin, a generic protein family, and reflectin, a cephalopod specific protein family, we point out for both families a striking molecular diversity in *S. officinalis*.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

In the present “-omic era”, dealing with non-standard species is a challenging task in evo–devo studies. Our laboratory focuses on cephalopods as new models in developmental biology. This zoological group belongs to, but is very derived within Mollusca, with highly specialized structures (funnel and arms derived from the mollusks' foot, muscular mantle) and a large and sophisticated nervous system including a “brain” resulting from the fusion of the main nervous ganglia (Budelmann, 1995). This brain, as well as the giant axon system, has been extensively studied; these structures are always considered as useful models in neurophysiology (Grant et al., 2006; Hochner et al., 2006; Walters and Moroz, 2009; Williamson and Chrachri, 2004). In addition, cephalopods begin to be considered of special interest for developmental and evolutionary studies. The development of cephalopods is quite original among mollusks, as (i) their telolecithal eggs lead to a discoidal segmentation, contrasting with the classical spiralian holoblastic cleavage of Lophotrochozoa and (ii) all subsequent

stages of development occur within egg envelopes, allowing a direct development with the emergence of so-called paralarvae (Boletzky, 1988). The development of some cephalopod species is morphologically well-known, but ground questions such as the cephalopod body plan orientation in regard to the mollusk body plan remain debated in the evo–devo context (Shigeno et al., 2010); they need a better knowledge of the molecular repertoire used by these animals to ensure their development. Cephalopods represent indeed a highly derived clade in which genes are recruited in order to assume ancient or new functions, thus demonstrating possible evolutionary processes (Baratte et al., 2007; Navet et al., 2008, 2009).

The accessible molecular toolbox is currently under development for several cephalopod species. ESTs data from different organs have been published or deposited in databases (Table 1): *Octopus vulgaris* and *Nautilus pompilius* eye (Ogura et al., 2004; Yoshida and Ogura, 2011), juvenile *Euprymna scolopes* light organ (Chun et al., 2006), *Idiosepius paradoxus* brain (Shigeno 2006 unpublished), *Sepiella maindroni* ink gland (Song 2009 unpublished), *Loligo bleekeri* liver (Kondo 2010 unpublished) and *Loligo pealeii* stellate ganglia (DeGiorgis 2011 unpublished, cited in Lico et al., 2010). However, none of these ESTs takes into account the developmental aspect of cephalopod genome expression, which is crucial in an evo–devo context. We decided to generate embryonic ESTs from whole embryos in order to be able to better address the gene recruitment novelties in cephalopods. We choose the cuttlefish (*Sepia officinalis*) because of

**Abbreviation:** ESTs, expressed sequence tags; NRS, non-redundant sequences; TCS, tentative contigs; KOG, eukaryotic orthologous groups; SAMS, Sequence Analysis and Management System; JGI, Joint Genome Institute; aa, amino acid.

\* Corresponding author at: MNHN, DMPA, BOREA, CNRS UMR7208, 55 rue Buffon, CP 51., 75005 Paris, France. Tel.: +33 1 4079 3097.

E-mail address: [bassaglia@mnhn.fr](mailto:bassaglia@mnhn.fr) (Y. Bassaglia).

**Table 1**  
Current available cephalopod ESTs.

Species	Organ	Nb of EST	Ref
<i>Sepiella maindroni</i>	Ink gland	899	Song 2009 <sup>a</sup>
<i>Euprymna scolopes</i>	Juvenile light organ	35,420	Chun et al., 2006
<i>Idiosepius paradoxus</i>	Brain	9079	Shigeno 2006 <sup>a</sup>
<i>Loligo bleekeri</i>	Liver	669	Kondo et al. 2010 <sup>a</sup>
<i>Loligo pealeii</i>	Stellate ganglia	22,033	DeGiogis 2011 <sup>a,b</sup>
<i>Octopus vulgaris</i>	Adult eye	16,432	Ogura et al., 2004
<i>Nautilus pompilius</i>	Adult eye	1037	Yoshida and Ogura, 2011

Data from the Taxonomy browser (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>) using cephalopoda as a query.

<sup>a</sup> No publication; only deposited in database.

<sup>b</sup> Cited in Lico et al., 2010.

(i) the availability of numerous morphological data regarding its development (Naef, 1928; Lemaire, 1970; Boletzky, 2006, our previous works) (ii) its ecological peculiarities, namely a nectobenthic mode of life, suggesting evolutionary processes at the interface of those of octopod (benthic) and squid (pelagic), (iii) their availability in European coasts, (iv) their eggs, big (compared to other cephalopod species) and convenient to collect and (v) the easiness to rear the embryos in lab (see our previous work).

To mine for the first time these EST, we focused on two structural protein families of interest, one as a generic protein example and one as a “cephalopod-specific” example.

The tubulin family is wide and well known (Khodiyar et al., 2007; Tuszyński et al., 2006). These cytoskeletal proteins (~50 kD) are of particular interest in developmental studies. They have been used as differentiation markers during molluscan development, for neurons (Baratte and Bonnaud, 2009) as well as other cell types such as trochoblasts, the first fully specified cells in molluscan free-swimming larvae (Damen et al., 1994). In addition, tubulins are implicated in mammalian neuronal morphogenesis, under the control of a network including numerous microtubule-associated proteins and signaling pathways (Jaaro and Fainzilber, 2006; Poulain and Sobel, 2010). Moreover, tubulin isotypes (Tischfield and Engle, 2010) and their post-transcriptional modified forms (Wloga and Gaertig, 2010) are known to be differentially implicated in normal brain development (Fukushima et al., 2009), axonal guidance and neuronal migration in mammals (alpha-tubulin: Creppe et al., 2009; beta-tubulin: Tischfield et al., 2010). Post-translational modifications of tubulin have also been implicated in higher-order memory encoding (Janke and Kneussel, 2010). All of these functions may reasonably be expected in cephalopods, in view of their highly organized brain as well as their learning and memory abilities (Hochner et al., 2006), thus tubulin diversity should exist in these animals. In spite of this potential interest, very few complete sequences are available in databases for cephalopods or even molluscan tubulins; as an example, there are only 7 molluscan complete (~450 aa) alpha-tubulin sequences (only one for Cephalopoda) in the Protein Knowledge database (see sup data – 3): the question of tubulin diversity in cephalopods remains open.

The reflectin family is considered so far as cephalopod-specific, and we looked for the expression of reflectin mRNA in *Sepia* embryos. These small (30/35 kD) proteins were initially described in *E. scolopes* light organ (Crookes et al., 2004); similar proteins have been described in *Loligo forbesi* eye (Weiss et al., 2005) and in *L. pealeii* skin (Izumi et al., 2010).

Reflectins are responsible of the iridescence of tissues in Cephalopoda, a property used in camouflage or communication (Mähger et al., 2009a). They are essential components of proteinaceous platelets sandwiched between plasma membrane folds, forming “stacks” of parallel platelets, described as iridosomes, in specialized cells (= iridophores); these stacks function as multilayer reflectors leading to iridescence (Arnold et al., 1974; Hanlon et al., 1990; Tao et al., 2010). Reflectins have a very unusual amino acid composition (rich in tyrosine,

methionine, arginine, tryptophan). All reflectins described so far show 4–6 repeating domains, each domain presenting a highly conserved sub-domain known as the reflectin motif [M/FD(X)<sub>5</sub>MD(X)<sub>5</sub>MD(X)<sub>3/4</sub>] (Crookes et al., 2004; Izumi et al., 2010). The self-assembling properties of reflectins have been demonstrated and are probably linked to this structure; they have also been shown to depend on the isoform studied: high concentrations of recombinant reflectin 1a from static iridophores of *E. scolopes* light organ formed water-insoluble filamentous structures in vitro (Kramer et al., 2007) whereas an homologous reflectin (A1) from dynamic iridophores of *L. pealeii* skin assembled into a colloidal gel in the same conditions (Tao et al., 2010). In addition, phosphorylation of reflectins has been proposed as a possible regulatory mechanism of dynamic iridescence in *L. pealeii* (Izumi et al., 2010). The diversity of reflectin isoforms expressed by these species may be related to a diversity of functions implying iridescence.

## 2. Material and methods

### 2.1. Collection of embryos

*S. officinalis* eggs were obtained from captive females (maintained in the biological station of Luc-sur-Mer, France) and maintained in the lab as described in Navet et al. (2008). In these conditions, the development was normal, as assessed by its time course and morphological observations. Embryos were staged using Lemaire's developmental table for *S. officinalis* (Lemaire, 1970) after removing the envelopes. They were fixed in RNA later (Sigma) and conserved at –80 °C in the same solution for later treatment.

### 2.2. Construction of normalized cDNA library

The construction was made by Creative Dynamics Inc. using standardized protocols. Briefly, total RNA was extracted using TRIZOL (Invitrogen) from *S. officinalis* embryos from stages 16 to 28. Amplified cDNA was obtained using Creator SMART cDNA library construction kit (Clontech) and normalized using Trimmer-Direct kit (Evrogen). As recommended by the manufacturer, the CDS 3M adapter provided by Trimmer-Direct kit was substituted to CDS3' PCR primer of SMART kit for the first-strand synthesis; the SMART IV oligonucleotide was used as 5' adapter.

### 2.3. EST sequencing

About 50,000 randomly chosen clones were sequenced. The libraries were plated, arrayed robotically and bacterial clones had their plasmid DNA amplified using phi29 polymerase. The plasmids were end-sequenced by the Genoscope using BigDye Termination kits on Applied Biosystems 3730xl DNA Analysers.

### 2.4. EST clustering and annotation

Data were treated using the “Sequence Analysis and Management System” (SAMS) EST pipeline (Bekel et al., 2009), an open source online pipeline developed by the Center for Biotechnology, Bielefeld University (web site: [http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/sams\\_info/](http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/groups/brf/software/sams_info/)).

After performing quality (phred13) and vector clipping, clustering was done using a slightly modified TIGR clustering pipeline implemented by the Bioinformatics Resource Facility team. The resulting TCs (tentative contigs) allowed the generation of a putatively non-redundant set of TCs and singlets, which was used in further analysis.

SAMS automatic annotation abilities were used on ESTs and on the non-redundant sets. Blast tools allowed automatic BLAST2 vs. different databases: nt (all GenBank + EMBL + DDBJ + PDB sequences, but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences), nr (all non-redundant GenBank CDS translations + PDB +

SwissProt + PIR + PRF, excluding environmental samples from WGS projects), SP (SwissProt only), KEGG, KOG and InterPro. The default cutoff E-value ( $1e^{-4}$ ) was used during this procedure. Automatic annotation was completed by SAMS Metanor annotation pipeline, using a cutoff E-value of  $1e^{-30}$ . All results are accessible on demand through SAMS interface.

### 2.5. KOG annotation repartition

The distribution of genes in KOG functional categories was obtained from 11 genome models for which KOG annotation has been done by the JGI, representing a large sampling of Eukaryota: *Trichoplax adhaerens* Grell-BS-1999 v1.0 (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/kogBrowser?db=Triad1>), *Monosiga brevicollis* v1.0 (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/kogBrowser?db=Monbr1>), *Dictyostelium purpureum* QSDP1 (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/kogBrowser?db=Dicpu1>), *Nematostella vectensis* v1.0v (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/kogBrowser?db=Nemve1>), *Helobdella robusta* v1.0 (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/kogBrowser?db=Helro1>), *Capitella teleta* v1.0 (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/kogBrowser?db=Capca1>), *L. gigantea* v1.0 (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/kogBrowser?db=Lotg1>), *Daphnia pulex* v1.0 (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/kogBrowser?db=Dappu1>), *Ciona intestinalis* v2.0 (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/kogBrowser?db=Cioin2>), *Branchiostoma floridae* v1.0 (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/kogBrowser?db=Brafl1>), *Xenopus tropicalis* v4.1 (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/kogBrowser?db=Xentr4>). For each species, the percentages of total gene number of each KOG category was calculated; to allow a rough comparison, the distribution of all specific results by KOG category was represented as boxplot using the R package (<http://www.r-project.org/>), using Q1 and Q3 quartiles as box limits, and to  $Q1-1.5(Q3-Q1)$  and  $Q3+1.5(Q3-Q1)$  as whisker adjacent values. KOG annotation distribution was obtained from the non-redundant set of *Sepia* ESTs, and was plotted onto this graph.

### 2.6. Actin, tubulin and reflectin analysis

Automatic annotations were used to find actin-, tubulin- and reflectin-annotated tc and singlets. This search was confirmed by blasting relevant known sequences against EST, tc and singlet databases through SAMS blast interface. All alignment and percentage identity calculations were done using Jalview 2 (Waterhouse et al., 2009).

Phylogenetic analysis was performed on the “phylogeny.fr” platform (Dereeper et al., 2008) accessible at <http://www.phylogeny.fr>. Sequences were automatically aligned with MUSCLE (Edgar, 2004) configured for highest accuracy (MUSCLE 3.7 with default settings). After alignment, ambiguous regions (i.e. containing gaps and/or poorly aligned) were removed with Gblocks (Castresana, 2000) using the following parameters: minimum length of a block after gap cleaning: 10, no gap positions allowed in the final alignment, all segments with contiguous nonconserved positions bigger than 8 rejected, minimum number of sequences for a flank position: 85%.

The phylogenetic tree was reconstructed using the maximum likelihood method implemented in the PhyML (v3.0 aLRT) program (Guindon and Gascuel, 2003). The default substitution model was selected assuming an estimated proportion of invariant sites and 4 gamma-distributed rate categories to account for rate heterogeneity across sites. The gamma shape parameter was estimated directly from the data. Reliability for internal branch was assessed using the approximate Likelihood-Ratio Test (Anisimova and Gascuel, 2006); all branches with support <50% were collapsed. In some cases, the bootstrapping method (500 bootstrap replicates) was used. Graphical representation and edition of the phylogenetic tree were performed with TreeDyn v198.3 (Chevenet et al., 2006).

## 3. Results and discussion

This paper describes the first developmental ESTs library obtained in a cephalopod species.

Embryos from stages 16 to 28 were used as (i) they allowed a reliable elimination of yolk, which badly interfered with RNA isolation procedures (data not shown) and (ii) they corresponded to the major steps of neurogenesis, in which our lab is mainly interested. Moreover, as the direct development of *S. officinalis* ended at stage 30 with the emergence of a para-larva, the organization of which is similar to the adult, these stages also covered all major steps of organogenesis. Thus, in the absence of whole genome sequencing data, we expected that our ESTs would sample all organs and come closer to whole genome sequencing as other published ESTs library dealing with specific organs (see Table 1).

### 3.1. Automatic annotation of ESTs library

The normalized cDNA library construction generated  $2.7 \times 10^6$  clones. 50,000 randomly chosen clones were sequenced and 48,537 ESTs were obtained. The average (median) lengths of ESTs were 555 (637) bp. In the absence of a cephalopod reference genome, these long sequences greatly facilitated the computational assembly.

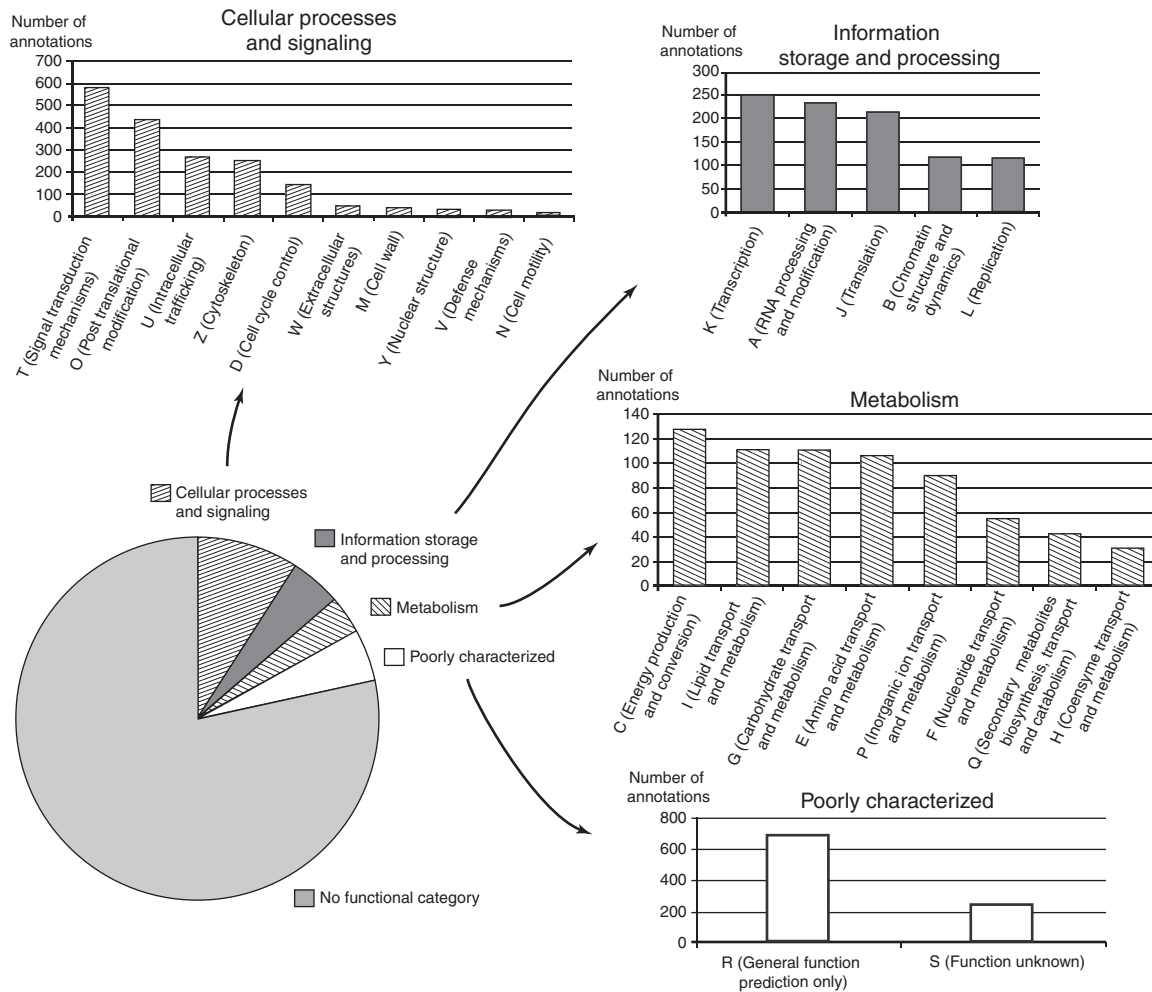
The SAMS automatic pipe-line retained 43,627 ESTs >50 bp (89.9% of total ESTs) for the clustering process. 28,282 ESTs (64.8% of retained ESTs) were clustered in 4435 tentative consensus (tc) sequences, and 15,345 ESTs (35.2%) remained as singletons. Therefore, 19,780 putatively non-redundant sequences (So-NRS) were obtained in this study. The average (median) lengths of tc and singletons were 923 (783) and 586 (631) bp respectively.

Automatic annotation was done by SAMS Metanor. 4917 sequences (24.8% of the So-NRS, corresponding to 53.5% of the tc and 16.6% of the singletons) were annotated with “high confidence” or tagged as “conserved hypothetical proteins”. Thus, around 75% of the putative proteins expressed as *S. officinalis* ESTs (So-ESTs) were not identified. This situation has already been encountered in bivalves (see references in Wang et al., 2011) and is probably, at least in part, due to the underrepresentation of molluscs or, more generally, of lophotrochozoan sequences in databases. On the other side, these NRS may also represent specific molecules, not yet characterized in more traditional models. The size of *S. officinalis* genome was experimentally evaluated as around 4Gb (data not shown) and thus close to the estimations made in few other cephalopod species (*Octopus vulgaris*: 4.2 Gb, Packard and Albergoni, 1970; *L. pealeii*: 2.7 Gb, *Octopus bimaculatus*: 4.2 Gb, Hinegardner, 1974; *Idiosepius paradoxus*: 2.1 Gb, *Nautilus pompilius*: 2.8 Gb, Yoshida et al., 2011). A probable whole-genome duplication event in the cephalopod lineage was proposed in two recent molluscan genome structure analysis (Hallinan and Lindberg, 2011; Yoshida et al., 2011). These genomes may contain some unexpected molecular systems, related to the highly derived status of this clade.

### 3.2. KOG annotation analysis

The distribution of automatic annotations of So-NRS in the different KOG categories was established (Fig. 1). The KOG “no functional category” annotation (X) represented circa 80% of the annotations. 9.1% of the annotations (42% of the non-X annotation) belonged to “cellular processes and signaling” categories, 4.6% (21% of the non-X) to “information storage and processing” and 3.4% (16% of the non-X) to “metabolism” categories.

To evaluate this distribution, we used already available KOG annotated genomic data, mainly from non vertebrates (JGI). As these distributions concerned genomic models, they were taken as indicators of the distribution of genes in KOG sub-categories in the genomes. These results were represented as box-plots. The distribution of So-



**Fig. 1.** Distribution of automatic annotations of *Sepia officinalis* non-redundant set in KOG categories. The pie chart shows the overall distribution in global functional families (Cellular processes and signaling, Information storage and processing, Metabolism, Poorly characterized and No functional category). Each histogram details the distribution of one functional family and shows the number of annotations observed in each KOG category. KOG categories: 1 – Cellular processes and signaling (D: Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; M: Cell wall/membrane/envelope biogenesis; N: Cell motility; O: Posttranslational modification, protein turnover, chaperones; T: Signal transduction mechanisms; U: Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; V: Defense mechanisms; W: Extracellular structures; Y: Nuclear structure; Z: Cytoskeleton). 2 – Information storage and processing (A: RNA processing and modification; B: Chromatin structure and dynamics; J: Translation, ribosomal structure and biogenesis; K: Transcription; L: Replication, recombination and repair). 3 – Metabolism (C: Energy production and conversion; E: Amino acid transport and metabolism; F: Nucleotide transport and metabolism; G: Carbohydrate transport and metabolism; H: Coenzyme transport and metabolism; I: Lipid transport and metabolism; P: Inorganic ion transport and metabolism; Q: Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism). 4 – Poorly characterized (R: General function prediction only; S: Function unknown). 5 – No functional category (X).

NRS annotations in KOG sub-categories is consistent with this distribution (Fig. 2), suggesting that the cDNA library was correctly normalized and that the diversity of *So*-ESTs may be representative of *S. officinalis* genome. A slight over-representation of genes implicated in protein synthesis and processing (A “RNA processing and modification”, J “translation, ribosomal structure and biogenesis”, O “post-translational modification, protein turnover, chaperones”) and in “energy production and conversion” (C), and an underrepresentation of genes implicated in “defense mechanisms” (V) were observed. This was coherent in a developmental context.

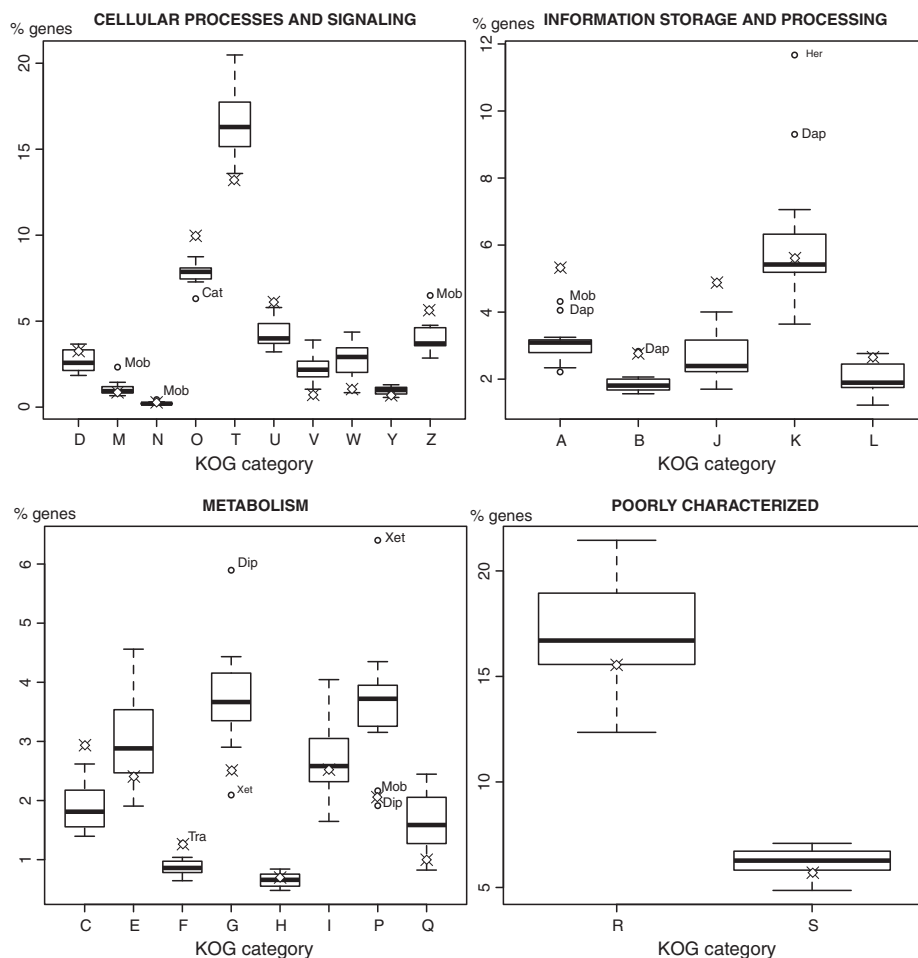
However, the underrepresentation of the “signal transduction mechanisms” category (T) was more surprising and not expected for organisms in development. Interestingly, numerous transcription factors, which are key regulators of development and of particular interest in our evo-devo context, were identified in *So*-ESTs by automatic annotations (for example the *pax* family, *nkx2.1*, *nkx2.5*, *six*, *twist*, ...) but some very conserved members of this functional category, such as *shh*, *engrailed*, the *Pou* or the MRF (myogenic regulatory factor) family, were apparently missing. This could be due to different technical reasons, such as a faint or time-limited expression preventing the presence of these genes in our cDNA library, which did not

cover the earliest stages of development for practical reasons. However, we did find some “early” transcription factors such as *otx* or *elav* family members in *So*-ESTs (Baratte, pers. com.). Thus, this distribution may reflect some specificity of cephalopod development, as we have previously demonstrated with *engrailed*, *shh* and *pax6* (Baratte et al., 2007; Navet et al., 2008, 2009).

In summary, the structure of our ESTs data was comparable with other known genomic data structure. In addition, the number of uni-genes detected in *S. officinalis* ESTs (19,780) was comparable to the number of genes obtained by whole genome sequencing in other species of Lophotrochozoa (*L. gigantea*: 17,305 genes, *Capitella telata*: 23,385 genes, *Helobdella robusta*: 17,729 genes. Data from the JGI). Thus we estimated that our ESTs were reasonably representative of the genome of *S. officinalis*.

### 3.3. Two actin isoforms are expressed during development

Cytoskeletal proteins were well-represented in *So*-ESTs. As the most abundant protein in animal cells, actin ESTs were very abundant in *So*-ESTs, but after clusterisation, only two tc (representing 244 and 15 ESTs) were automatically annotated as actin. An investigation into



**Fig. 2.** *Sepia officinalis* automatic annotations in KOG categories are similar to other known annotation sets. The % of genes annotated in each KOG functional category was calculated from the data available at the JGI for 11 automatically annotated animal genomes: *Nematostella vectensis*, *Ciona intestinalis*, *Branchiostoma floridae*, *Capitella teleta* (Cat), *Helobdella robusta* (Her), *Lottia gigantea*, *Daphnia pulex* (Dap), *Dictyostelium purpureum* QSDP1 (Dip), *Trichoplax adhaerens* Grell-BS-1999 (Tra), *Xenopus tropicalis* (Xet), *Monosiga brevicollis* (Mob). Boxes denote Q1 and Q3 quartiles, black line Q2 quartile (median); whiskers are adjacent values to  $Q1 - 1.5(Q3 - Q1)$  and  $Q3 + 1.5(Q3 - Q1)$ . Outliers are indicated as circles. *Sepia officinalis* non-redundant set (diamond cross) was used in this comparison. Same KOG category abbreviations as in Fig. 1.

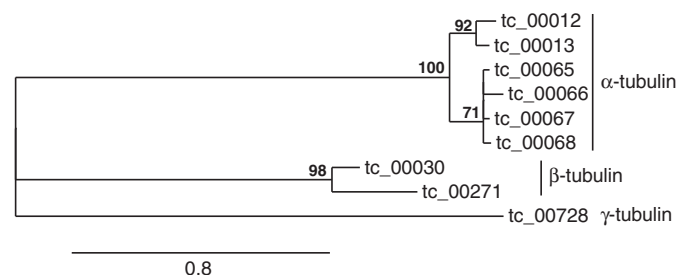
these clusters confirmed their homogeneity. Thus, the complete sequence of two actin forms (So Actin I: 1128 bp, 376 aa; So Actin II: 1125 bp, 375 aa; sequences in sup data – 1) were obtained, corresponding respectively to So Actin clone 17 (GenBank ID: AF234902; percentage of identity = 97.32%) and clone 5 (GenBank ID: AF234903; percentage of identity = 99.62%) partial cd described by Carlini et al. (2000) which published an exhaustive study of an actin fragment [F<sup>91</sup>–S<sup>351</sup>] in cephalopods, including *S. officinalis*. Our actin sequences were not identical to those reported by these authors, probably due to some sequencing errors in this previous study. We found no evidence of expression of the third actin form (GenBank ID: AF234904) identified at the genomic level by these authors in *S. officinalis*. Noteworthy, Carlini et al. (2000) strongly suggested that this actin isoform (actin III) gene was a pseudogene. Our results are in agreement with this view, although alternative explanations were also conceivable. For example, this isoform could be developmentally regulated and expressed in later stages of development, or simply missing as the result of a sampling bias as 50,000 clones out of 2.6 millions were sequenced.

### 3.4. Tubulin diversity and its possible signification

10 tcs were automatically annotated as tubulin: 6 as alpha-(152, 186, 16, 11, 39 and 15 ESTs), 3 as beta-(20, 18 and 108 ESTs) and 1 as gamma-tubulin (8 ESTs). One beta-tubulin annotated tc (20 ESTs) didn't give a complete tubulin sequence and was discarded in

further analysis. The translation of alpha-tubulin, beta-tubulin and gamma-tubulin annotated tc gave 451/453 aa, 445 aa and 452 aa respectively (sequences in sup data – 2).

A MLH analysis confirmed the repartition of these tc in three highly supported groups, at the cDNA (Fig. 3) as well as the protein level (sup data – 2). Two sub-groups of alpha-tubulin were well-supported by cds analysis, but not at the protein level. The percentage of identity between translated cd was 93% to 99% in the alpha-tubulin group, 91% between the two beta-tubulins. There was ≈40% of identity between *S. officinalis* alpha- and beta-tubulins, and 30% between gamma-tubulin and other isoforms (Table 2); these values were



**Fig. 3.** Phylogenetic analysis of *So*-tubulin cds. Values indicated near the nodes are bootstrap percentages based on 500 replicates; nodes with bootstrap values <50% were collapsed. Three highly supported groups, corresponding to alpha-, beta- and gamma-tubulin are present. The alpha-tubulin group is particularly diversified.

**Table 2**  
Percentage identity after pairwise alignment between *So*-tubulin translated cd.

	tc_00012	tc_00013	tc_00065	tc_00066	tc_00067	tc_00068	tc_00030	tc_00271	tc_00728
tc_00012	-								
tc_00013	94.91	-							
tc_00065	94.04	97.57	-						
tc_00066	93.36	96.24	96.69	-					
tc_00067	94.25	97.57	98.90	97.57	-				
tc_00068	93.81	96.68	96.69	95.58	96.90	-			
tc_00030	39.69	40.49	39.96	40.93	40.49	40.71	-		
tc_00271	39.21	40.44	39.29	40.66	40.22	40.22	91.91	-	
tc_00728	32.03	31.37	31.81	32.24	31.81	31.37	33.63	32.52	-

Light gray, gray and black indicate alpha-, beta- and gamma-tubulin, respectively. In the table, alpha/alpha and beta/beta tubulin percentage identities are shaded accordingly.

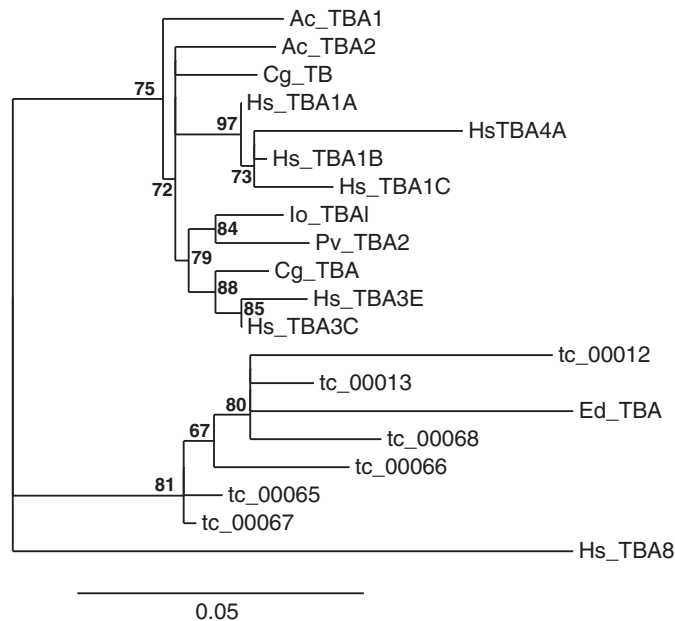
comparable to the values observed between human isoforms (data not shown).

No identified molluscan gamma-, delta- or epsilon-tubulin sequence was obviously available in molecular databases (NCBI, EMBL). A search in *L. gigantea* genome (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/browserLoad?db=Lotg1>) allowed us to find a gamma-tubulin sequence (position sca\_118:578462-590436) and to confirm the presence of at least one gamma-tubulin in molluscs. There was 86% identity between *Sepia* and *Lottia* gamma-tubulins. Although putative sequences for delta-(sca\_139:417069-420211) and epsilon-(sca\_115:735743-743134) tubulins were also found in *L. gigantea* genome, no delta- or epsilon-tubulin could be detected either in *So*-NRS automatic annotation or by blasting *So*-ESTs with relevant sequences (Human, *L. gigantea*).

The results presented here strongly suggested the existence of at least three different tubulin genes in *S. officinalis*. The phylogenetic analysis suggested the possibility of at least two different alpha-tubulin cDNA. This remains to be confirmed at the genomic level.

Alpha-tubulin was of particular interest in the cephalopod neurogenesis field, as this form has been described as a neuronal and developmental marker, and we have already shown that acetylated tubulin is detectable in *Sepia* (Baratte and Bonnaud, 2009). The alpha-tubulin group was further explored by constructing larger sets of sequences including *S. officinalis* alpha-tubulin sequences, known molluscan complete alpha-tubulin sequences present in the Protein Knowledge Database (see sup data – 3) and human alpha-tubulin sequences (Khodiyar et al., 2007). Phylogenetic analysis showed all cephalopod sequences (*S. officinalis*, *Enteroctopus dofleini* UniProt ID: Q06331) grouped in a strongly supported (aLR ≈ 80%) monophyletic group (Fig. 4). Enlarging the set progressively conducted to the same result, even when all complete alpha-tubulin sequences mined from the protein Knowledge database were used (sup data – 4). This suggested that the complex repertoire of alpha-tubulin isoforms has emerged independently in the cephalopods.

Adding to this diversity, *S. officinalis* alpha (and beta) tubulins presented numerous sites known to allow post-translational modification (see Janke and Kneussel, 2010; Wloga and Gaertig, 2010 for reviews), including glutamylation (C-term GLU-rich region), detyrosination/ $\Delta$ 2-tubulin generation site (alpha-tubulin C-term: GLU-TYR,) and acetylation (main site: alpha-tubulin K40, although other sites such as K60, 112, 311, 326, 370, 394, 401 have recently been described by Choudhary et al., 2009; see Wloga and Gaertig, 2010 for a review).



**Fig. 4.** Phylogenetic analysis of molluscs and human alpha-tubulins complete sequences.- Values indicated near the nodes are approximate Likelihood-Ratio Test (SH-Like) results; all branches with support <50% were collapsed. Alpha-tubulins sequences used: *Aplysia californica*: Ac\_TBA1 (UniProt ID: Q8T6A5), Ac\_TBA2 (UniProt ID: Q8T6A4), *Crassostrea gigas*: Cg\_TB (UniProt ID: Q5H7U8), Cg\_TBA (UniProt: Q5NT89), *Enteroctopus dofleini*: Ed\_TBA (UniProt ID: Q06331), *Homo sapiens*: Hs\_TBA1A (UniProt ID: Q71U36), Hs\_TBA1B (UniProt ID: P68363), Hs\_TBA1C (UniProt ID: Q9BQE3), Hs\_TBA3C (UniProt ID: Q13748), Hs\_TBA3E (UniProt ID: Q6PEY2), Hs\_TBA4A (UniProt ID: P68366), Hs\_TBA8 (UniProt ID: Q9NY65), *Ilyanassa obsoleta*: Io\_TBA1 (UniProt ID: A8CKC8), *Patella vulgata*: Pv\_TBA2 (UniProt ID: P41383). The translated cd of *Sepia officinalis* alpha-tubulins was added to the set.

These modifications are considered as informative and part of a “tubulin-code” allowing a proper cellular morphology and microtubule function (Verhey and Gaertig, 2007; Hammond et al., 2008; Janke and Kneussel, 2010).

Interestingly, one of the *S. officinalis* alpha-tubulin (tc\_00066) clearly showed a modification of the main acetylation site (K<sup>40</sup>), as observed in human only in TUB8, an isoform described as particularly expressed in human heart, skeletal muscle and testis, with a barely detectable expression in brain (Stanchi et al., 2000). This modified site was not observed in other known molluscan tubulins. The fact that a non-acetylatable tubulin also emerged in *S. officinalis* “independent” alpha-tubulin set strongly suggests an important role for this tubulin modification. Tubulin acetylation has been implicated in neuronal migration during development (Creppe et al., 2009), and TUB8 has been suggested as a possible neuronal immobilization signal (Abdollahi et al., 2009), the mechanism of which remains unclear (see Braun et al., 2010 for discussion). The exact physiological significance of this non-acetylatable form during *S. officinalis* development, as well as the existence and the roles of other modified tubulin forms, remains to be explored: this repertoire could be of particular interest for the construction of a complex nervous system such as the cephalopods’ “brain”.

### 3.5. The reflectin repertoire of *S. officinalis* is the largest known in cephalopod species

The initial description of reflectins in *E. scolopes* (Crookes et al., 2004) described 6 reflectins, which may be categorized in 2 groups regarding their structure. Each isoform was supposed to be generated by one gene, and amplification of genomic DNA demonstrated the absence of intron in these reflectin genes (Crookes et al., 2004). Izumi et al. (2010) have extended the repertoire of reflectins by the description of 3 different forms in *L. pealeii*.

**Table 3**  
Percentage identity after pairwise alignment between So reflectins translated cd.

	tc_00052	tc_00082.1	tc_00082.2	tc_00082.3	tc_00082.4	tc_00082.5	tc_00082.6	tc_00083	tc_00084	tc_00085.1	tc_00085.2	tc_00238
(Number of ESTs)	(59)	(15)	(5)	(9)	(6)	(5)	(6)	(10)	(11)	(24)	(12)	(19)
tc_00052	–											
tc_00082.1	58.54	–										
tc_00082.2	59.18	<b>98.35</b>	–									
tc_00082.3	58.94	<b>95.88</b>	<b>96.30</b>	–								
tc_00082.4	57.72	<b>98.35</b>	<b>97.53</b>	<b>95.06</b>	–							
tc_00082.5	57.44	94.65	94.65	93.42	93.00	–						
tc_00082.6	59.09	<b>95.88</b>	<b>95.47</b>	93.83	94.24	<b>96.25</b>	–					
tc_00083	65.54	75.00	75.82	75.52	73.36	73.44	75.00	–				
tc_00084	66.90	85.43	85.43	84.84	83.81	87.14	88.11	81.97	–			
tc_00085.1	64.97	90.24	91.06	88.89	89.43	89.30	87.40	82.59	90.07	–		
tc_00085.2	64.97	90.65	89.84	79.73	89.84	78.35	87.80	82.59	89.73	<b>97.25</b>	–	
tc_00238	24.07	22.84	22.84	22.84	22.84	22.60	21.92	23.17	23.14	23.81	23.81	–

Colors represent percentage identity (black: <50%, gray: <76%, light gray: <90%). Percentage identity >95% are bolded.

Six tc were identified as reflectins by automatic annotation, representing 162 ESTs. All analyses were done at the protein level (240 to 292 aa; sequences in sup data – 5). One tc (tc\_00238, 19 EST, translation 268 aa) was markedly different from all other *S. officinalis* reflectins (% id < 25%, Table 3), presenting only the first reflectin-like domain, as *L. pealeii* rlpB1; % id between tc\_00238 and rlpB1 was 51%. These reflectins may have a role in the assemblage of several

reflectin types within the platelet, giving peculiar optical properties (DeMartini, pers. com.). These sequences were not included in further phylogenetic analysis.

Five repeating domains with their highly conserved sub domains were present in other *S. officinalis* reflectins, except from one cluster (tc\_00082) where the first domain was largely truncated (sup data – 5). Moreover, alignment of So-ESTs sequences inside this tc revealed a diversity of reflectin which was apparently not taken into account during the clustering procedure. This was also the case for tc\_00085, and these two clusters were subdivided accordingly. Each probable isoform was represented by at least 5 ESTs. There was 93–98% identity between reflectin isoforms issued from a single cluster (Table 3); these values are comparable to those of Crookes et al. (2004) regarding *E. scolopes* reflectins.

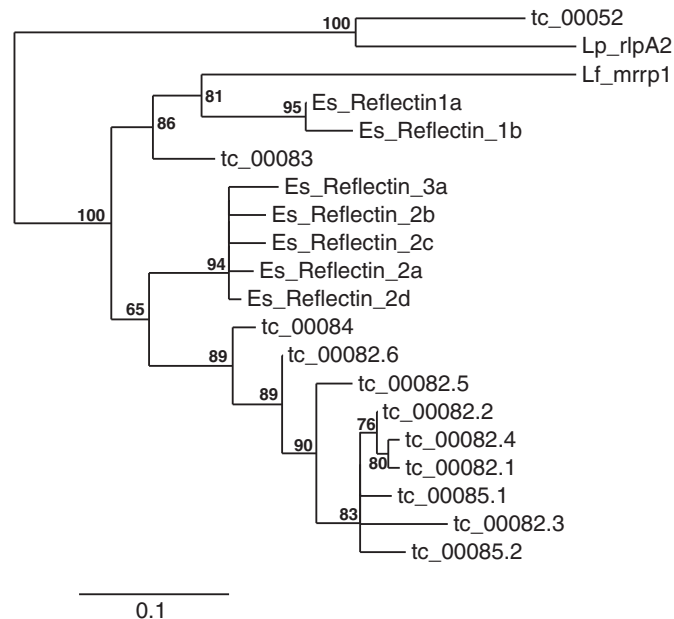
*E. scolopes* reflectin 1 was arbitrarily used as a reference to compare the overall structure of *S. officinalis*, *E. scolopes* and *L. pealeii* reflectins (Fig. 5, alignment in sup data – 6). Compared to the other cephalopods, all *E. scolopes* reflectins presented a small insert (3aa) in repeat domain 3.

The first repeat was the most variable part of the molecule, presenting gaps and/or inserts depending of the isoform. More importantly, the overall structure of tc\_00052, the most represented *S. officinalis* reflectin (59 ESTs), was clearly close to *L. pealeii* rlpA2, as was tc\_00083 to *E. scolopes* reflectin1, and tc\_00084 to *E. scolopes* reflectin 2. This was confirmed in phylogenetic analysis (Fig. 6). In addition to the already signaled tc\_00238/*L. pealeii* rlpB1 group, this comparison emphasized the fact that *S. officinalis* expressed a repertoire of reflectins which covered all described types of reflectin structure, including at the same time types of reflectins previously implicated in statically (*E. scolopes* light organ) and dynamically (*L. pealeii* skin) reflective tissues. This study is the first demonstration of the expression of both



**Fig. 5.** Comparison of cephalopods reflectin protein sequences. The structure of *Euprymna scolopes* reflectin 1 group was arbitrarily taken as reference for comparison. The repeat domains (black rectangles) including the reflectin motif (named SD = conserved subdomain, after Crookes et al., 2004; gray) are aligned. Boxes over the sequence represent insertions (including the supplementary repeat domain of *Loligo pealeii* rlpA1, depicted as SD6-containing domain); hatched zones underline gaps. The alignment is available as supplemental data in fasta format. *Loligo pealeii* rlpB1 (UniProt ID: D3UA45), tc\_00278 and *Loligo forbesi* mrrp1 (UniProt ID: Q8MPP4) were not included in the figure for simplification. Es\_Ref 1: structure of *Euprymna scolopes* reflectin 1a (UniProt ID: Q6WDN8) and 1b (UniProt ID: Q6WDN7), Es\_Ref2, Es\_Ref3: structure of *Euprymna scolopes* 2a (UniProt ID: Q6WDN5), 2b (UniProt ID: Q6WDN4), 2c (UniProt ID: Q6WDN3), 2d (UniProt ID: Q6WDN2) and 3a (UniProt ID: Q6WDN6). Lp\_rlpA1: structure of *Loligo pealeii* rlpA1 (UniProt ID: D3UA43). Lp\_rlpA2: structure of *Loligo pealeii* rlpA2 (UniProt ID: D3UA44). So\_tc\_00082.I: structure of *Sepia officinalis* tc\_00082.1, tc\_00082.2, tc\_00082.3 and tc\_00082.4. So\_tc\_00082.II: structure of tc\_00082.5 and tc\_00082.6.





**Fig. 6.** Phylogenetic analysis of *So* reflectins translated cd. Values indicated near the nodes are approximate Likelihood-Ratio Test (SH-Like) results; all branches with support <50% were collapsed. Sequences from *Euprymna scolopes* (Es\_Reflectin), *Loligo pealeii* (Lp\_rlpA2) and *Loligo forbesi* (Lf\_mrpp1) were included in the dataset.

types in one cephalopod species. This large repertoire suggested that *S. officinalis* may use all aspects of iridescence functions in cephalopods.

Reflectins are implicated in cephalopod camouflage and communication (Mähger et al., 2009a, 2009b). In our study, reflectins were detected before hatching, suggesting that these mechanisms could be efficient as soon as hatching occurs, participating to the camouflage patterns described at these stages in *Sepia* (Barbosa et al., 2007). Skin iridescence was described as a dynamic process, and phosphorylation of reflectins was underlined as an important factor in the regulation of dynamic iridescence in *L. pealeii* by Izumi et al. (2010). The putative phosphorylation sites confirmed to be indeed phosphorylated by these authors were present in *S. officinalis* reflectins, suggesting the possibility of a similar regulation (see sup data – 6). Interestingly, one site (Y<sup>127</sup> in *L. pealeii* rlpA1) presented a phenylalanine in numerous *S. officinalis* isoforms (F<sup>136</sup> in tc\_00085.1 and tc\_00085.2, F<sup>132</sup> in tc\_00084 and F<sup>88</sup> in tc\_00082.1–6, except tc\_00082.3) and was therefore unsuitable for phosphorylation, suggesting that these isoforms may have a different role in iridescence. The physiological significance of these post-translational modifications clearly needs more study to be understood. Together with the highly diverse repertoire of reflectins, the existence of such subtle regulatory processes underlined the remarkable possibilities of *S. officinalis* genome among cephalopod species, suggesting that *S. officinalis* could be an interesting candidate as a cephalopod representative species for whole genome sequencing.

#### 4. Conclusion

The embryonic ESTs library presented here is a new and promising tool, not only in an evo–devo context but also as a resource in physiological, behavioral, or any biological studies. But there is a clear need of other data in the lophotrochozoan field, particularly at the genome level. The fact that a large diversity of molecular isoforms are expressed in *S. officinalis*, regarding generic (tubulin) as well as clade-specific (reflectin) molecules, suggest that this species could be a good candidate for a genome sequencing project, at least as a representative of the Cephalopoda clade.

#### Acknowledgments

We thank Joel Henry from the University of Caen and the Station Marine of Luc/Mer (University of Caen), Sébastien Henry from the Station Biologique de Roscoff (UPMC) for providing biological material and Sébastien Baratte for helpful discussions. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR; Grant JC/JC 0043).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.gene.2012.01.100.

#### References

- Abdollahi, M.R., et al., 2009. Mutation of the variant alpha-tubulin TUBA8 results in polymicrogyria with optic nerve hypoplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 85, 737–744.
- Anisimova, M., Gascuel, O., 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55, 539–552.
- Arnold, J.M., Young, R.E., King, M.V., 1974. Ultrastructure of a cephalopod photophore. II. Iridophores as reflectors and transmitters. *Biol. Bull.* 147, 522–534.
- Baratte, S., Bonnaud, L., 2009. Evidence of early nervous differentiation and early catecholaminergic sensory system during *Sepia officinalis* embryogenesis. *J. Comp. Neurol.* 517, 539–549.
- Baratte, S., Andouche, A., Bonnaud, L., 2007. Engrailed in cephalopods: a key gene related to the emergence of morphological novelties. *Dev. Genes Evol.* 217, 353–362.
- Barbosa, A., Mähger, L.M., Chubb, C., Florio, C., Chiao, C.C., Hanlon, R.T., 2007. Disruptive coloration in cuttlefish: a visual perception mechanism that regulates ontogenetic adjustment of skin patterning. *J. Exp. Biol.* 210, 1139–1147.
- Bekel, T., et al., 2009. The Sequence Analysis and Management System – SAMS-2.0: data management and sequence analysis adapted to changing requirements from traditional sanger sequencing to ultrafast sequencing technologies. *J. Biotechnol.* 140, 3–12.
- Boletzky, S.v., 1988. Characteristics of Cephalopod embryogenesis. In: Wiedmann, J., Kullmann, J. (Eds.), *Cephalopods – Present and Past*. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, pp. 167–179.
- Boletzky, S.v., 2006. The *Sepia* egg: a showcase of cephalopod embryology. *Vie et Milieu* 56, 191–201.
- Braun, A., Breuss, M., Salzer, M.C., Flint, J., Cowan, N.J., Keays, D.A., 2010. Tuba8 is expressed at low levels in the developing mouse and human brain. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 819–822 author reply 822–3.
- Budelmann, B.U., 1995. The cephalopod nervous system: what evolution has made of the molluscan design. In: Breidbach, O., Kutsch, W. (Eds.), *The Nervous System of Invertebrates: An Evolutionary and Comparative Approach*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 115–138.
- Carlini, D.B., Reece, K.S., Graves, J.E., 2000. Actin gene family evolution and the phylogeny of coleoid cephalopods (Mollusca: Cephalopoda). *Mol. Biol. Evol.* 17, 1353–1370.
- Castresana, J., 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17, 540–552.
- Chevenet, F., Brun, C., Banuls, A.L., Jacq, B., Christen, R., 2006. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinforma.* 7, 439.
- Choudhary, C., et al., 2009. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325, 834–840.
- Chun, C.K., et al., 2006. An annotated cDNA library of juvenile *Euprymna scolopes* with and without colonization by the symbiont *Vibrio fischeri*. *BMC Genomics* 7, 154.
- Creppe, C., et al., 2009. Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell* 136, 551–564.
- Crookes, W.J., Ding, L.-L., Huang, Q.L., Kimbell, J.R., Horwitz, J., McFall-Ngai, M.J., 2004. Reflectins: the unusual proteins of squid reflective tissues. *Science* 303, 235–238.
- Damen, W.G., van Grunsven, L.A., van Loon, A.E., 1994. Transcriptional regulation of tubulin gene expression in differentiating trochoblasts during early development of *Patella vulgata*. *Development* 120, 2835–2845.
- Dereeper, A., et al., 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 36, W465–W469.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Fukushima, N., Furuta, D., Hidaka, Y., Moriyama, R., Tsujiuchi, T., 2009. Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *J. Neurochem.* 109, 683–693.
- Grant, P., Zheng, Y., Pant, H.C., 2006. Squid (*Loligo pealeii*) giant fiber system: a model for studying neurodegeneration and dementia? *Biol. Bull.* 210, 318–333.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704.
- Hallinan, N., Lindberg, D.R., 2011. Comparative analysis of chromosome counts infers three paleopolyploidies in the Mollusca. *Genome Biol. Evol.* 3, 1150–1163.
- Hammond, J.W., Cai, D., Verhey, K.J., 2008. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 71–76.
- Hanlon, R.T., Cooper, K.M., Budelmann, B.U., Pappas, T.C., 1990. Physiological color change in squid iridophores. I. Behavior, morphology and pharmacology in *Lolliguncula brevis*. *Cell Tissue Res.* 259, 3–14.
- Hinegardner, R., 1974. Cellular DNA content of the Mollusca. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* 47, 447–460.
- Hochner, B., Shomrat, T., Fiorito, G., 2006. The octopus: a model for a comparative analysis of the evolution of learning and memory mechanisms. *Biol. Bull.* 210, 308–317.

- Izumi, M., et al., 2010. Changes in reflectin protein phosphorylation are associated with dynamic iridescence in squid. *J. R. Soc. Interface* 7, 549–560.
- Jaaro, H., Fainzilber, M., 2006. Building complex brains—missing pieces in an evolutionary puzzle. *Brain Behav. Evol.* 68, 191–195.
- Janke, C., Kneussel, M., 2010. Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci.* 33, 362–372.
- Khodiyar, V.K., et al., 2007. A revised nomenclature for the human and rodent alpha-tubulin gene family. *Genomics* 90, 285–289.
- Kramer, R.M., Crookes-Goodson, W.J., Naik, R.R., 2007. The self-organizing properties of squid reflectin protein. *Nat. Mater.* 6, 533–538.
- Lemaire, J., 1970. Table de développement embryonnaire de *Sepia Officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). *Bull. Soc. Zool. Fr.* 95, 773–782.
- Lico, D.T., et al., 2010. A novel 65 kDa RNA-binding protein in squid presynaptic terminals. *Neuroscience* 166, 73–83.
- Mähgler, L.M., Denton, E.J., Marshall, N.J., Hanlon, R.T., 2009a. Mechanisms and behavioural functions of structural coloration in cephalopods. *J. R. Soc. Interface* 6 (Suppl. 2), S149–S163.
- Mähgler, L.M., Shashar, N., Hanlon, R.T., 2009b. Do cephalopods communicate using polarized light reflections from their skin? *J. Exp. Biol.* 212, 2133–2140.
- Naef, A., 1928. Die Cephalopoden (Embryologie). Bardi (Roma). Friedländer & sons, Berlin.
- Navet, S., Bassaglia, Y., Baratte, S., Martin, M., Bonnaud, L., 2008. Somatic muscle development in *Sepia officinalis* (cephalopoda — mollusca): a new role for NK4. *Dev. Dyn.* 237, 1944–1951.
- Navet, S., Andouche, A., Baratte, S., Bonnaud, L., 2009. Shh and Pax6 have unconventional expression patterns in embryonic morphogenesis in *Sepia officinalis* (Cephalopoda). *Gene Expr. Patterns* 9, 461–467.
- Ogura, A., Ikeo, K., Gojobori, T., 2004. Comparative analysis of gene expression for convergent evolution of camera eye between octopus and human. *Genome Res.* 14, 1555–1561.
- Packard, A., Albergoni, V., 1970. Relative growth, nucleic acid content and cell numbers of the brain in *Octopus vulgaris* (Lamarck). *J. Exp. Biol.* 52, 539–552.
- Poulain, F.E., Sobel, A., 2010. The microtubule network and neuronal morphogenesis: dynamic and coordinated orchestration through multiple players. *Mol. Cell. Neurosci.* 43, 15–32.
- Shigeno, S., Takenori, S., Boletzky, S., 2010. The origins of cephalopod body plans: a geometrical and developmental basis for the evolution of vertebrate-like organ systems. In: Tanabe, K., Shigeta, Y., Sasaki, T., Hirano, H. (Eds.), *Cephalopods — Present and Past*. Tokai University Press, Tokyo, pp. 23–34.
- Stanchi, F., et al., 2000. TUBA8: a new tissue-specific isoform of alpha-tubulin that is highly conserved in human and mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 1111–1118.
- Tao, A.R., DeMartini, D.G., Izumi, M., Sweeney, A.M., Holt, A.L., Morse, D.E., 2010. The role of protein assembly in dynamically tunable bio-optical tissues. *Biomaterials* 31, 793–801.
- Tischfield, M.A., Engle, E.C., 2010. Distinct alpha- and beta-tubulin isotypes are required for the positioning, differentiation and survival of neurons: new support for the 'multi-tubulin' hypothesis. *Biosci. Rep.* 30, 319–330.
- Tischfield, M.A., et al., 2010. Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. *Cell* 140, 74–87.
- Tuszynski, J.A., Carpenter, E.J., Huzil, J.T., Malinski, W., Luchko, T., Luduena, R.F., 2006. The evolution of the structure of tubulin and its potential consequences for the role and function of microtubules in cells and embryos. *Int. J. Dev. Biol.* 50, 341–358.
- Verhey, K.J., Gaertig, J., 2007. The tubulin code. *Cell Cycle* 6, 2152–2160.
- Walters, E.T., Moroz, L.L., 2009. Molluscan memory of injury: evolutionary insights into chronic pain and neurological disorders. *Brain Behav. Evol.* 74, 206–218.
- Wang, A., Wang, Y., Gu, Z., Li, S., Shi, Y., Guo, X., 2011. Development of expressed sequence tags from the pearl oyster, *Pinctada martensii* Dunker. *Mar. Biotechnol. (NY)* 13, 275–283.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191.
- Weiss, J.L., et al., 2005. Methionine-rich repeat proteins: a family of membrane-associated proteins which contain unusual repeat regions. *Biochim. Biophys. Acta* 1668, 164–174.
- Williamson, R., Chrachri, A., 2004. Cephalopod neural networks. *Neurosignals* 13, 87–98.
- Wloga, D., Gaertig, J., 2010. Post-translational modifications of microtubules. *J. Cell Sci.* 123, 3447–3455.
- Yoshida, M.A., Ogura, A., 2011. Genetic mechanisms involved in the evolution of the cephalopod camera eye revealed by transcriptomic and developmental studies. *BMC Evol. Biol.* 11, 180.
- Yoshida, M.A., et al., 2011. Genome structure analysis of molluscs revealed whole genome duplication and lineage specific repeat variation. *Gene* 483, 63–71.

Article n°4

Andouche, A., Bassaglia, Y., Baratte, S., & Bonnaud, L. (2013). Reflectin genes and development of iridophore patterns in *Sepia officinalis* embryos (Mollusca, Cephalopoda). *Developmental Dynamics, Wiley Online Library*, 242:560-571

# Reflectin Genes and Development of Iridophore Patterns in *Sepia officinalis* Embryos (Mollusca, Cephalopoda)

Aude Andouche,<sup>1\*</sup> Yann Bassaglia,<sup>1,2</sup> Sébastien Baratte,<sup>1,3</sup> and Laure Bonnaud<sup>1,4</sup>

**Background:** In the cuttlefish *Sepia officinalis*, iridescence is known to play a role in patterning and communication. In iridophores, iridosomes are composed of reflectins, a protein family, which show great diversity in all cephalopod species. Iridosomes are established before hatching, but very little is known about how these cells are established, their distribution in embryos, or the contribution of each reflectin gene to iridosome structures. **Results:** Six reflectin genes are expressed during the development of iridosomes in *Sepia officinalis*. We show that they are expressed in numerous parts of the body before hatching. Evidence of the colocalization of two different genes of reflectin was found. Curiously, reflectin mRNA expression was no longer detectable at the time of hatching, while reflectin proteins were present and gave rise to visible iridescence. **Conclusion:** These data suggest that several different forms of reflectins are simultaneously used to produce iridescence in *S. officinalis* and that mRNA production and translation are decoupled in time during iridosome development. *Developmental Dynamics* 242:560–571, 2013. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** cephalopod; reflectin genes; expression pattern; development; iridophores

## Key findings:

- All reflectin genes (six) are expressed during embryonic development in *Sepia officinalis*.
- mRNA expression of these reflectins were detected in iridophores beginning late embryogenesis (at stage 25).
- Reflectin proteins are rapidly produced and reflectin mRNA synthesis is attenuated before hatching.
- Reflectin genes appear to be coexpressed in areas of future iridescence.

Accepted 20 January 2013

## INTRODUCTION

Color patterns in animals are common adaptations involved in camouflage and/or in inter and intraspecific communication. Colors are mostly obtained by means of pigment components that absorb specific wavelengths (carotenoids, melanins, or flavins; Fox, 1953; Bandaranayake,

2006) and/or by physical structures with a selective reflectance of incident light (Fox, 1953; Vukusic and Sambles, 2003). Most cephalopods species living in shallow water, such as squids, cuttlefish, and octopuses, exhibit a reduced and internalized shell and their skin has evolved into an elaborate organ for color patterning. This patterning is intimately linked

to their behavior and ecological life history (Hanlon and Messenger, 1996). Colors of cephalopods derive from both pigments and physical structures produced and stored by specialized cells: chromatophores, leucophores, and iridophores. Chromatophores are dermic superficial neuromuscular organs made of one folded cell containing yellow, red, or brown pigments that

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

<sup>1</sup>Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), DMPA, UMR Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), MNHN CNRS 7208, IRD 207, UPMC, Paris, France

<sup>2</sup>Université Paris Est Créteil-Val de Marne (UPEC), Faculté de sciences, Créteil, France

<sup>3</sup>Université Paris Sorbonne - Paris 4, Paris, France

<sup>4</sup>Université Paris Diderot - Sorbonne Paris Cité, Paris, France

\*Correspondence to: Aude Andouche, Muséum National d'Histoire Naturelle, 55 Rue Buffon, CP 51, 75005 Paris, France.

E-mail: andouche@mnhn.fr

DOI: 10.1002/dvdy.23938

Published online 5 February 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

become visible when the cell is stretched out by surrounding muscular cells (Cloney and Foley, 1968; Florey, 1969; Mirow, 1972a; Dubas, 1987; Gaston and Tublitz, 2006). Under the chromatophore layer, leucophores provide a structural white background whereas iridophores are responsible for an iridescence using additional wavelengths (pink, blue, and green) (Mirow, 1972a,b; Hanlon, 1982; Cloney and Brocco, 1983). By operating these cells, cephalopods can create a complex repertoire of body patterns using colors across the entire visible spectrum (Packard and Hochberg, 1977; Hanlon and Messenger, 1988; Chiao and Hanlon, 2001; Hanlon, 2007; Kelman et al., 2007; Hanlon et al., 2009).

In animals, iridescence mostly comes from crystalline nanostructures of guanine or hypoxanthine that act as multilayer reflectors (Fox, 1953; Land, 1972; Vukusic and Sambles, 2003). Interestingly, cephalopods are unique among metazoans because their iridescence is due to protein platelets intercalated with plasma membrane folds. The resulting structure, called an iridosome, presents all the characteristics of a multilayer reflector (Arnold et al., 1974; Hanlon et al., 1990; Tao et al., 2010). Iridosomes reflect light through thin-film interference (Denton and land, 1971; Cooper et al., 1990; Mäthger and Denton, 2001; Holt et al., 2011) and are also able to polarize light (Shashar and Hanlon, 1997; Mäthger and Hanlon, 2006; Chiou et al., 2007). Physiological studies have even shown that individuals are able to control iridescence intensity (Hanlon, 1982; Cooper and Hanlon, 1986; Cooper et al., 1990; Hanlon et al., 1990; Mäthger et al., 2004). Proteins of cephalopod iridophores were first characterized in the light-organ of *Euprymna scolopes* and called reflectins (Crookes et al., 2004). Six reflectin genes and three reflectin cDNAs have been found in the *Euprymna scolopes* light organ (Crookes et al., 2004) and in the skin of the squid *Loligo pealeii* (Izumi et al., 2010), respectively. More recently, the analysis of an expressed sequence tag (EST) library from embryonic stages of *Sepia officinalis* suggests the expression of at least six different reflectin mRNAs during development (Bassaglia et al. 2012).

Cephalopods develop directly without any larval stage or metamorpho-

sis, and hatching in *S. officinalis* gives rise to a juvenile morphologically identical to an adult and with a similar necto-benthic ecological life history (Boletzky et al., 2006). It has been demonstrated that cuttlefish hatchlings already possess most of the structures implicated in body patterning and use them as adults do (Hanlon and Messenger, 1988). Iridescence, which indicates the presence of reflectins, is observed in *S. officinalis* juveniles, which suggests that iridophores are established during embryogenesis (Hanlon and Messenger, 1988, 1996). In juveniles and adults, iridophores are present in eyes, and in the skin of the arms, head, and mantle. Each is supposed to have a specific role in patterning and/or communication (Shashar et al., 2000; Barbosa et al., 2007; Mäthger et al., 2009a,b). The recent confirmation that at least six different reflectin mRNAs exist in *S. officinalis* raises the question of potential specific properties and of probable tissue-specific expression. In this study, we performed an extensive search for reflectin genes in *S. officinalis* and we compared their sequences with those of mRNA and contigs from the EST library. We here demonstrated that the diversity of reflectin forms in *S. officinalis* is not due to splicing events but to six clearly distinguishable genes. The reflectin genes of *S. officinalis* are highly conserved, which makes their discrimination difficult by in situ hybridization (ISH). Nonetheless, we thoroughly investigated the expression patterns of some reflectin forms and provide a first spatio-temporal description of the iridophore development. Comparisons of in situ hybridizations with significantly different probes do not show any obvious tissue-specific expression which suggests that the evolutionary diversification of reflectin forms is more a question of physical or assembling properties rather than of organ-specific color patterning.

## RESULTS

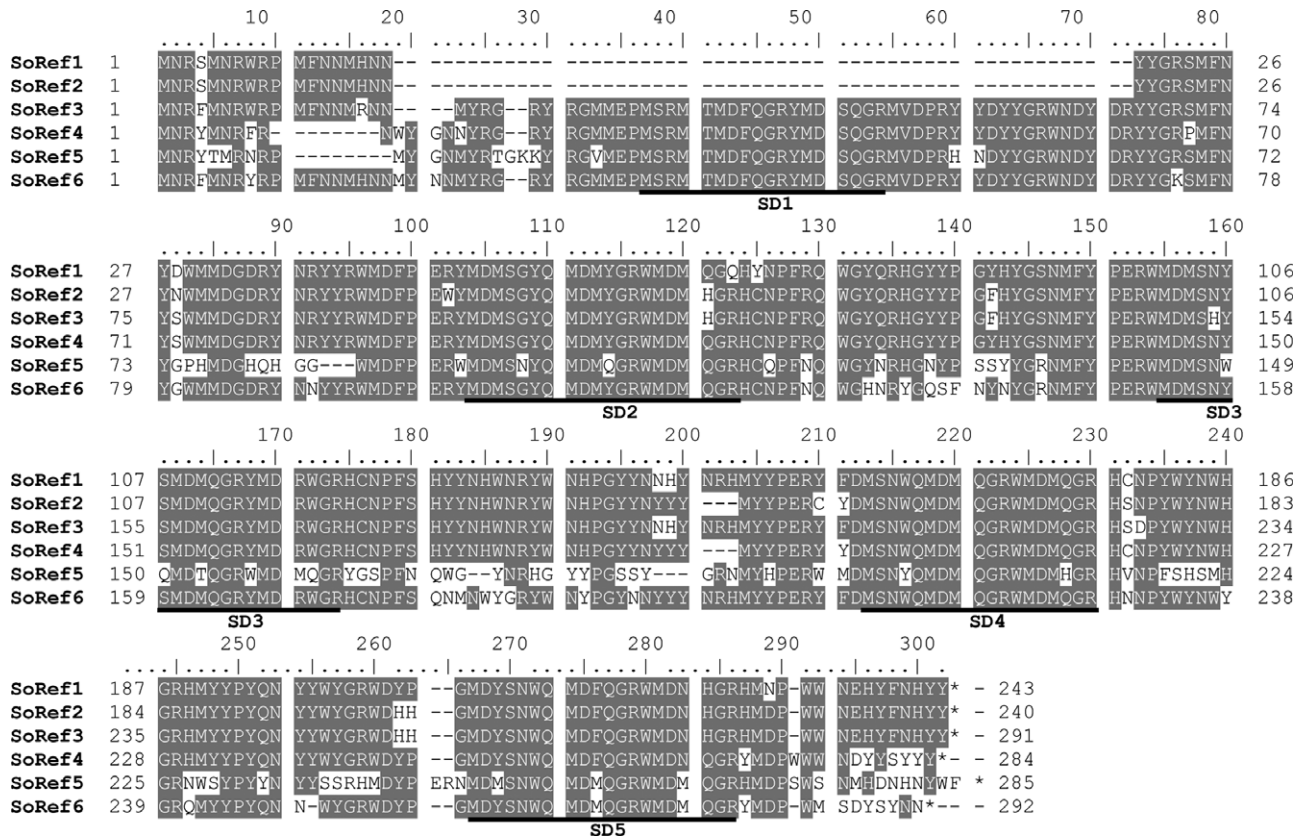
### Reflectin Genes in *Sepia officinalis*

As stated in Bassaglia et al. (2012), six tentative contigs (TCs) of reflect-

tins have been identified in the EST library we previously made from *S. officinalis* embryos at different developmental stages. To confirm that these TCs correspond to real mRNAs, specific primers were designed (Supp. Table S1, which is available online) and polymerase chain reaction (PCR) amplifications were performed on cDNA obtained from a pool of RNA from stage 20 to 29 *S. officinalis* embryos (Supp. Table S1). After cloning and sequencing PCR products, numerous sequences of equivalent size were obtained and identified as reflectins by BLAST analysis. We then considered that sequences with a percentage of identity lower than 95% (after conceptual translation) were issued from mRNA of different genes or from differently spliced mRNAs of a same gene. As a result, six different predicted protein sequences of reflectin were identified in *Sepia officinalis* (Supp. Table S1). We also amplified genomic DNA using the same primers. We obtained six PCR products corresponding to the six mRNA forms, with exactly the same length and with highly similar sequence (see Supp. Fig. S1 for alignments). Therefore, we assume that each of these six DNA sequences are coding parts of six different reflectin genes whose expression leads, without splicing event, to the six mRNA forms we detected. Four reflectin forms—*SoRef3*, *SoRef4*, *SoRef5*, and *SoRef6*—show the five repeated sequences, including a highly conserved subdomains (SD) [M/FD(X)<sub>5</sub>MD(X)<sub>5</sub>MD(X)<sub>3/4</sub>] as defined by Crookes et al. (2004). The two other forms, *SoRef1* and *SoRef2*, lack the first repeated sequence (Fig. 1).

### Evidence of Iridescence in *S. officinalis* Embryos

We evaluated the occurrence of functional iridophores by visual detection of iridescence, after removing the egg capsule of living embryos. Iridescence was first detected in the eyes of late embryos at stage 27, which is three stages before hatching (Fig. 2A). At stage 29, iridescence also appeared as dots in the skin of the dorsal side of the mantle, of the head and of the arms (Fig. 2B). At stage 30, a higher density of iridophores was visible on



**Fig. 1.** Predicted protein sequences of the six reflectins of *S. officinalis*. Alignments of reflectin proteins *SoRef1*–*SoRef6* predicted from cDNA sequences. Conserved amino acid residues are highlighted in black. The alignment shows five highly conserved motifs named SD (underlined).

the skin of different areas throughout the embryo (Fig. 2C–E). In the skin, iridophores were either isolated or organized as lines or clusters. Iridescent lines, pink or purple, were located on the dorsal side of the arms 1, 2, and 3 (Fig. 2D) and on the lateral side of the mantle, iridophores are gathered into a row of clusters (Fig. 2E,F). Some iridophores were also harbored in the numerous papillae located throughout the dorsal side of the mantle (Fig. 2C). We did not observe iridescence cues on the ventral side of the mantle (data not shown).

### ***SoRef* Expression During Development**

To discriminate the expression of different forms of reflectin by ISH, three antisense RNA probes were synthesized from the three most different reflectin sequences: one from *SoRef3* (AS-3), one from *SoRef5* (AS-5) and one from *SoRef6* (AS-6) (Supp. Fig. S1). The percentage of difference of

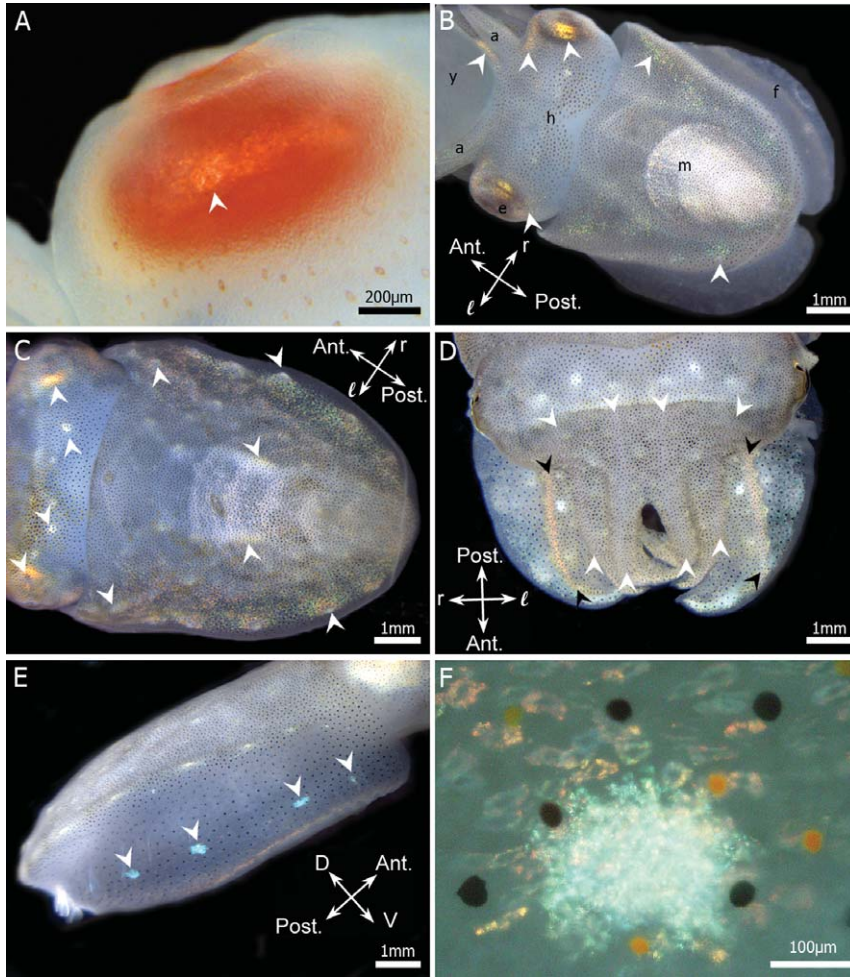
these three probes is between 10 and 20% (Supp. Table S2). Because of the high similarity of the different reflectin sequences, a probability exists that an antisense probe, such as AS-5, will hybridize not only *SoRef5* endogenous mRNAs but also other reflectin mRNAs. We, therefore, tested if our antisense probes hybridized with nonspecific reflectin mRNAs using “competitive ISH”. For each antisense probe, we performed *in situ* hybridizations either with the antisense probe alone (positive control) or with its corresponding sense probe (S-3, S-5, or S-6; negative control) or with a mix of the two other sense probes (test, Fig. 3). The results showed that AS-3 is not inactivated by S-5 and S-6, which strongly suggests that AS-5 and AS-6 recognize different targets than AS-3 (Fig. 3A–C). However, AS-5 and AS-6 are inactivated by, respectively, S-6 and S-5 (Fig. 3D–I), which suggests that these probes have similar mRNA targets.

ISHs were performed using antisense probe AS-3 and AS-5. The stain-

ing patterns obtained with the two probes were identical at the embryonic stages tested (25 to 30) of the embryo (Supp. Fig. S2). The expression patterns we observed were always bilateral, so we here describe them without specifying any left or right.

### *In the mantle skin*

*SoRef3* and *SoRef5* were detected in three areas of the mantle skin. On the dorsal side of the mantle, limited by the fins, reflectin expression started at stage 26 in clusters of cells (Fig. 4A,B,G,H), which progressively grew up. At stages 27–28, reflectin was expressed in more new intercalated clusters and isolated cells, progressively covering the dorsal surface (Figs. 4C,D,I,J, 5D). As expected, these stained areas correspond to areas of iridescent cells in living embryos (Fig. 2B,C). However, staining became less detectable starting at 28/29 (Fig. 4E,K) and was progressively replaced by a whitish color,



**Fig. 2.** Evidence of iridescence in living *S. officinalis* embryos before hatching. **A:** dorsal view of the right eye of a stage 27 embryo showing faint iridescence (arrow). **B:** dorsal view of a stage 29 embryo. Iridescence (arrows) is visible in both eyes, on the dorsal side of mantle, on the head and in the arms. **C:** dorsal view of a stage 30 embryo with iridescence on the dorsal side of the mantle in a multitude of papillae (white arrowheads) and on the head. **D:** dorsal view of the head of a stage 30 embryo showing lines of pink (black arrowhead) and purple (white arrowhead) iridescence on the arms. **E:** Lateral view of a stage 30 embryo showing a cluster of iridescent cells in the right lateral side of the mantle. **F:** Focus on a cluster of iridescent cells at the lateral side of the mantle, stage 30. a, arms; e, eye; f, fin; h, head; m, mantle; y, yolk sac; Ant, anterior; Post, posterior; l, left; r, right; D, dorsal; V, ventral.

suggesting that reflectin proteins were produced (Fig. 4F,L).

The lateral sides of the mantle (from the fins to the lateral skin papilla) showed a similar dynamic of reflectin expression (Fig. 5). A row of lateral clusters (lc) appeared at stage 26: first two clusters (Fig. 5A,B), then four clusters at stage 27 (Fig. 5C), five at stage 28 (Fig. 5D), and finally six from stage 29 (Fig. 5E,F). This spatial organization is similar to that observed in the living embryos (Fig. 2E). Sections confirmed in all cases the dermal localization of the positive cells (see Fig. 5G). As on the dorsal side, ISH staining decreased in clus-

ters as soon as a whitish color appeared inside (e.g., from stage 29, for the two first clusters lc1 and lc2, Fig. 5E).

The ventral side of the mantle and the fins were devoid of any reflectin expression during development (data not shown), and which is consistent with the iridescence distribution we observed in living embryos.

#### *In the skin on the head*

The skin on the dorsal side of the head mostly showed isolated positive cells and some numerous clustered positive cells (Fig. 4). The expression

of reflectin mRNA started at stage 27 (Fig. 4C,O) and corresponded, as expected, to the areas where iridescence appeared in living embryos (Fig. 2). As in the mantle skin, the mRNA expression was transient in positive cells and was followed, from stage 30, by a whitish color likely corresponding to reflectin protein production (Fig. 4F,R). The skin of the ventral side of the head exclusively showed isolated cells expressing reflectin with a similar developmental timing (data not shown).

#### *In the eyes*

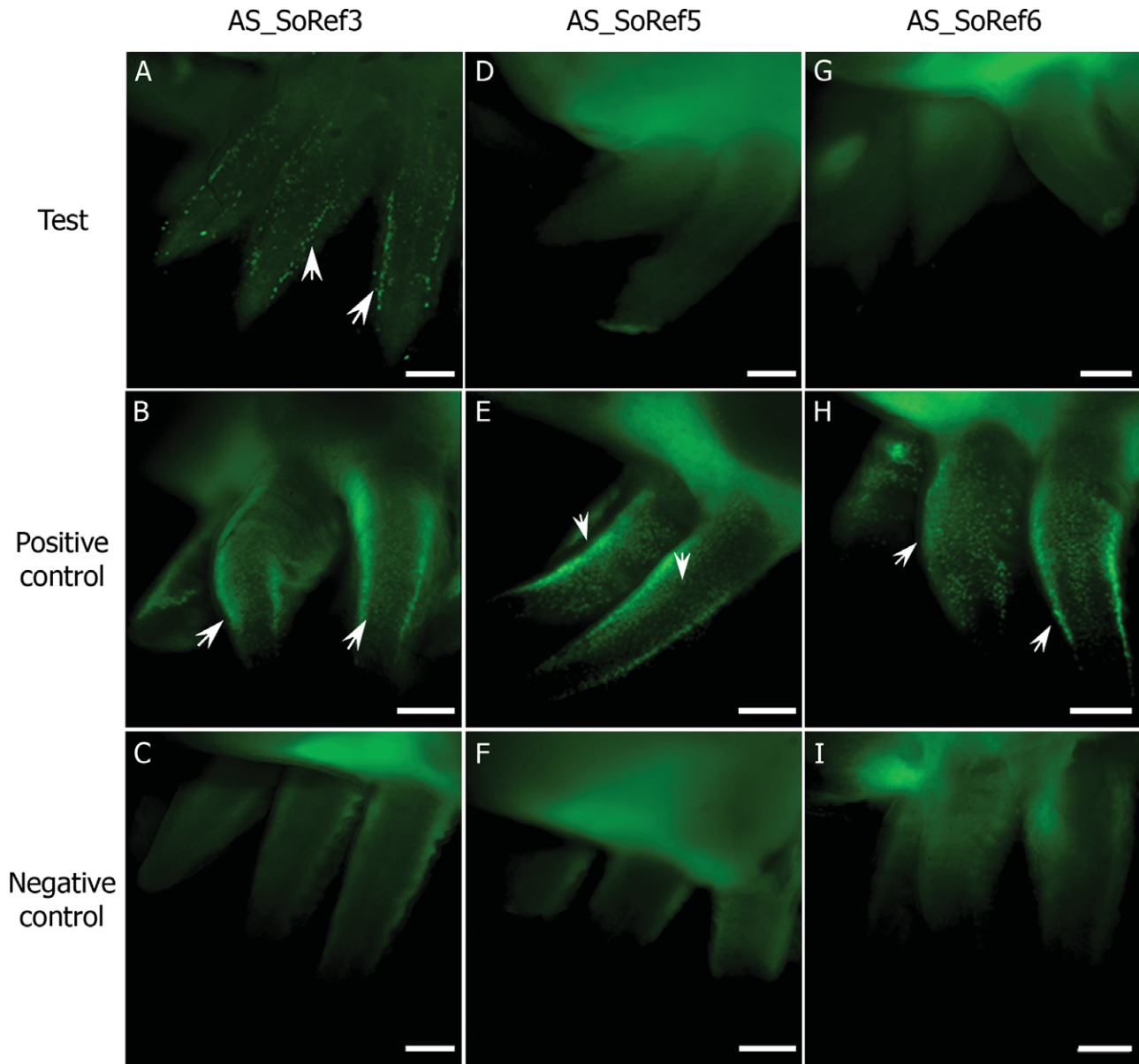
The first expression of reflectins in the eyes was observed at stage 25 in some cells of the iris (Fig. 6A,G). At the following stages, all cells of the iris expressed reflectins (Fig. 6B,C). This expression progressively decreased from stage 27 to stage 30 (Fig. 6D,E,H) and at stage 30, most iris cells showed iridescence (Fig. 6F). A secondary eye structure, the cornea, which consists of two converging skin folds covering the iris, showed positive reflectin cells from stage 27 to stage 30 (Fig. 6C,D,E,F).

#### *In the arm skin*

The expression of reflectin in arms appeared mostly in isolated dermal cells, but also in some proximal cell clusters (Fig. 7). These expressions are restricted to the outer side of the arms (the suckered inner side is devoid of reflectin expression, Fig. 7G). From stage 26 to stage 29, reflectin expression extended from proximal to distal areas. At stage 30, whitish cells became visible and one longitudinal stripe along each arm appeared except in arms 4 and 5 (Fig. 7F) as observed in living embryos (Fig. 2D). Interestingly, there was no reflectin expression in the arms 4, which are the longest arms specialized in prey capture (tentacles).

#### *Double in situ hybridization*

We then investigated whether or not the mRNAs hybridized by AS-3 and AS-5 were co-expressed at the cellular level. The results of double fluorescent in situ hybridization showed that AS-3 and AS-5 were mostly



**Fig. 3.** Test of probe specificity by whole-mount fluorescent in situ hybridization: focus on arms at stage 27. Arrows point out positive cells. **A–C:** Test of the AS-3 probe. **D–F:** Test of the AS-5 probe. **G–I:** Test of the AS-6 probe. The “test” line shows hybridizations using the tested antisense probe with the sense probes of the two other forms. The “positive control” line shows hybridization using the tested antisense probe alone. The “negative control” line shows hybridizations using the tested antisense probe with its corresponding sense probe. Scale bars = 300  $\mu\text{m}$ .

co-hybridized and were rarely in different cells (see Fig. 8, for arms and eyes). This was true independently of the region of the body.

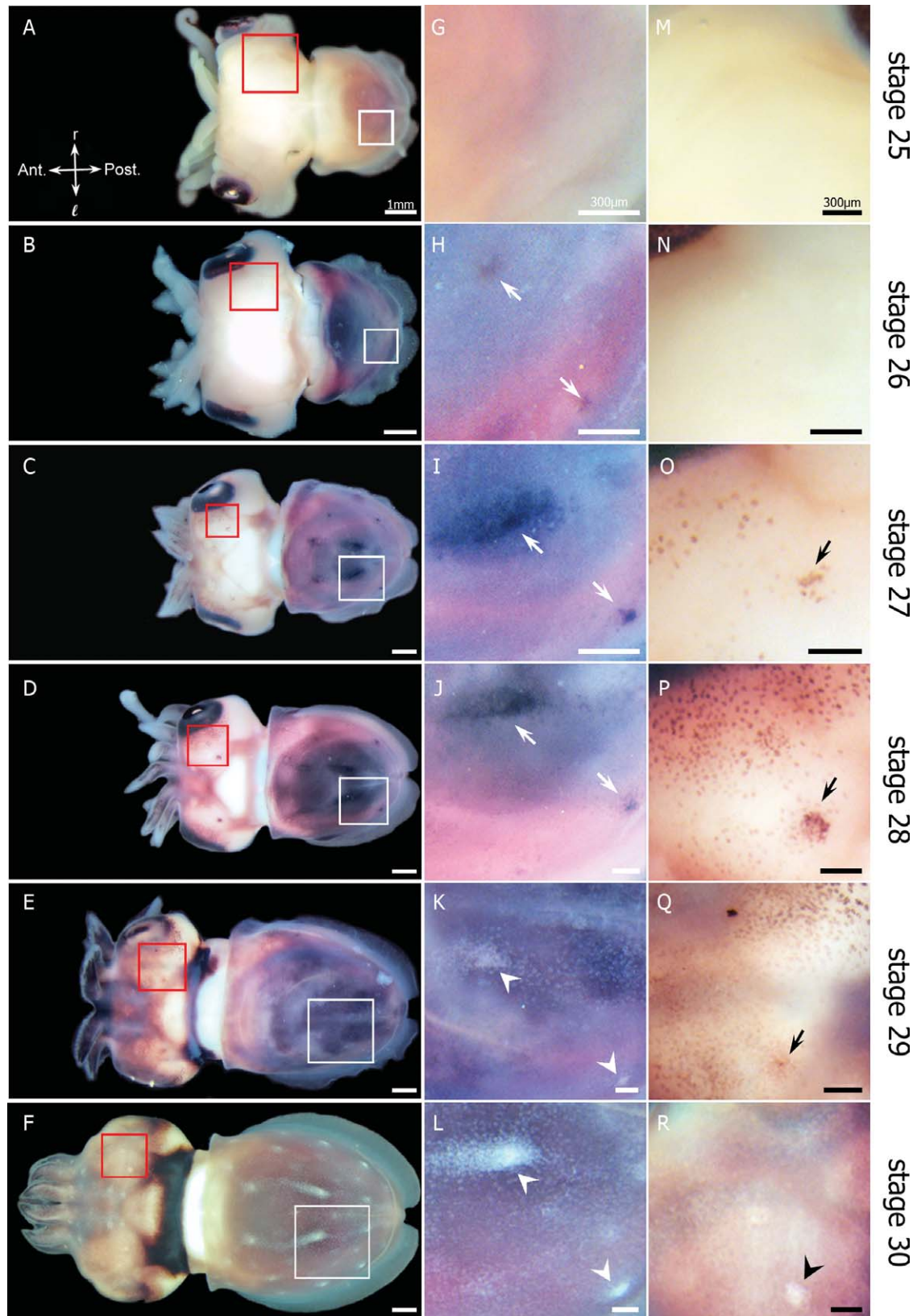
## DISCUSSION

Our careful search for reflectin cDNAs and for their associated genomic coding sequences allows us to confirm that *S. officinalis* possesses at least six different reflectin genes, which we called *SoRef1* to *SoRef6* (Supp. Fig. S1). This result is consist-

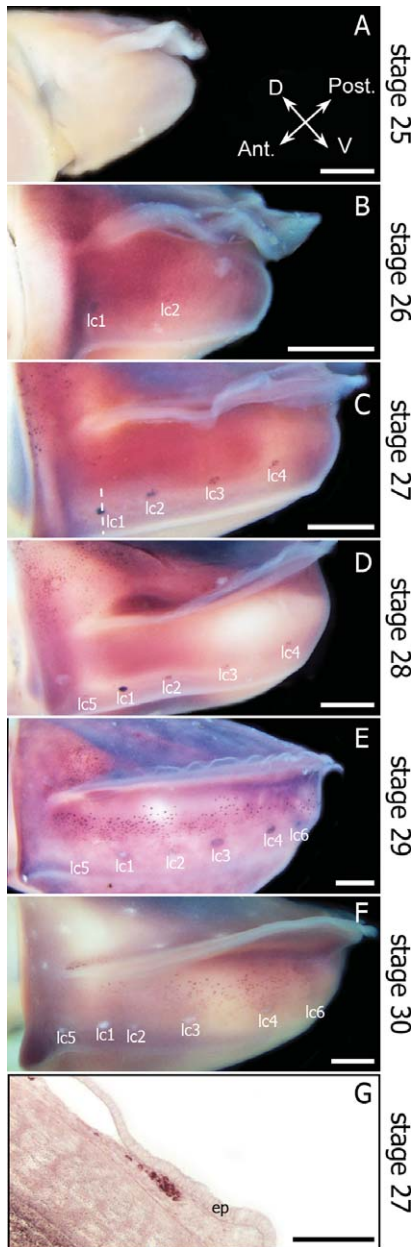
ent with that of Crookes et al. (2004) who suggested the existence of at least six reflectins in *E. scolopes*. In both *S. officinalis* and *E. scolopes*, reflectin coding sequences show no intron (see comparisons of cDNA and genomic sequences in Supp. Fig. S1; Crookes et al. 2004). Reflectin genes are specific to the cephalopod clade (Crookes et al., 2004) and have been identified in several species, each showing different ecological life histories. The relationships between the diversity of reflectins and their use

for patterning should be explored. Extensive genomic studies in other cephalopod species are needed to fully understand the evolution of the reflectin genes. In particular, very few data exist in pelagic species despite the fact that their use of iridescence is among the most sophisticated of cephalopods (Hanlon, 1982). Currently, searching for reflectin mRNAs in the skin of *L. pealeii* (Izumi et al., 2010) and in the eyes of *L. forbesi* (Weiss et al., 2005) has only detected three (in *L. pealeii*) and one (in *L. forbesi*)





**Fig. 4.** Reflectin expression on the dorsal side of *S. officinalis* embryos (arms, head and mantle) from stage 25 to 30 as revealed by whole mount in situ hybridization with AS-3. **A–F:** Dorsal view of the whole embryo, white squares focus on the same area on the mantle surface (magnified in G–L); red squares focus on the same area on the head surface (magnified in M–R). **G–L:** Reflectin expression in two magnified clusters on the dorsal side of the mantle from stage 25 to 30. Reflectin expression in cells (white arrows) becomes undetectable and seems replaced at stage 29 by a whitish color in the very place where iridescence is detected in living embryos (white arrowheads). **M–R:** Reflectin expression on the portion of the head skin, following one spot from stage 25 to 30. Reflectin expression in cells (black arrows) becomes undetectable and is replaced by a whitish color at stage 30 where iridescence is detected in living embryos (black arrowhead). Scale bars = 1 mm in A–F, 300  $\mu$ m in G–R. ant, anterior; Post, posterior; l, left; r, right.



**Fig. 5.** Reflectin expression on the left lateral side of the mantle in *S. officinalis* embryos from stage 25 to 30 as revealed by whole mount in situ hybridization with AS-3. **A–F:** reflectin expression showing gradual apparition of clusters of positive cells (named lc1 to lc6) and positive isolated cells. **G:** Transverse section of a stage 27 embryo throughout the lc1 cluster (white dotted-line in C) showing reflectin positive cells under the epithelium. Scale bars = 1 mm. ant, anterior; post, posterior; l, left; r, right; D, dorsal; V, ventral.

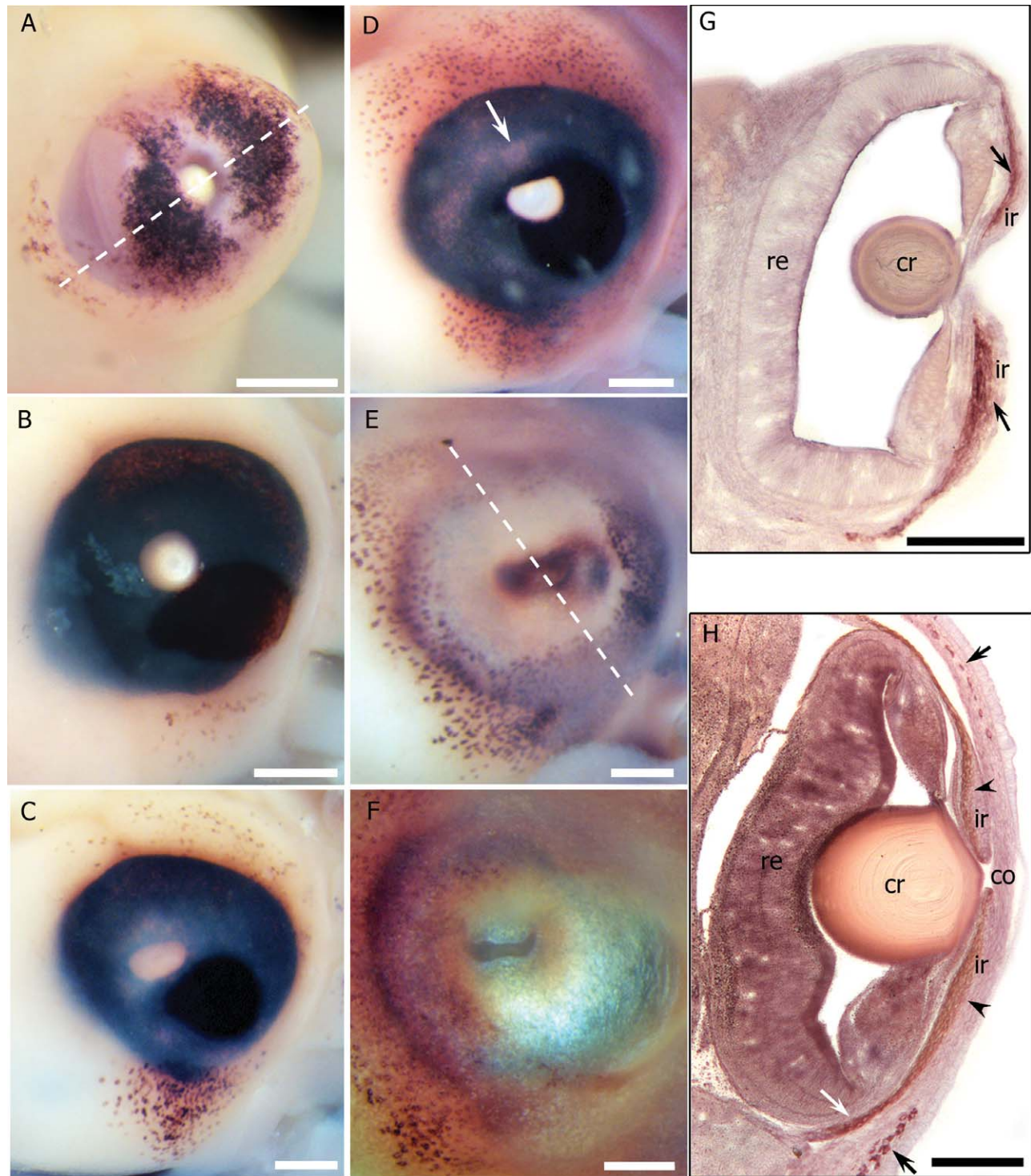
different reflectin forms, and no data exist on their reflectin genes.

We know that the six reflectin genes we detected in *S. officinalis* are expressed during embryogenesis because we found their corresponding

mRNAs in our embryonic EST library and through PCRs on embryonic cDNAs. As expected, in situ hybridizations using reflectin forms as antisense probes reliably label the developing iridophores, permitting us to follow the developmental dynamics of iridescent structures. For instance, the territories labeled by AS-3 (antisense probe designed from *SoRef3*) actually correspond to territories where iridescence is detected in decapsulated embryos (Fig. 2): in the eyes and skin on arms, head, and mantle (Figs. 4–7). Nonetheless, describing the specificity of each of the six different reflectin genes turned out to be a much more detailed endeavor. We first ascertained that our probes could distinguish the highly similar reflectin mRNAs. Comparing the signals obtained with these probes in ISH provided good evidence that reflectin mRNAs may not be specifically distributed among tissues and organs but rather expressed in all tissues (see eye and arm in Fig. 8). This result is consistent with previous studies in which different reflectins were identified in a single organ: six forms were found in the light organ in *E. scolopes* (Crookes et al., 2004) and three forms in the skin of *L. pealeii* (Izumi et al., 2010). At the tissue level, our analysis of co-expression even demonstrates that mRNAs of different reflectins can be expressed in a single cell at the same time (Fig. 8). As multilayer reflectors in iridophores are made of reflectin proteins self-organized in platelets (Kramer et al., 2007), it is possible that several different reflectin forms assemble into a single iridophore. In *S. officinalis*, the six reflectin sequences do not have the same number of repeated sequences (4 in *SoRef1* and *SoRef2*; 5 in *SoRef3*, 4, 5, 6). These differences at the level of the sequence may have an influence on the tertiary and quaternary structure of the proteins and on the optical properties they confer to the iridophores in which they are assembled. A more extensive study about platelet composition should be therefore conducted to confirm if the evolutionary diversification of the reflectin genes into six forms is actually linked to selection on their optic or assembling properties.

This study shows for the first time the dynamic expression of reflectin genes during the embryonic development of a cephalopod. Expression of reflectin mRNA was observed in the later stages of development: the earliest expression was detected at stage 25, in the eyes, five stages before hatching. Although we thought that expression would last through hatching and be maintained in juveniles, we observed that it was actually transient. In most of the tissues concerned, reflectin positive cells were generally positive during three stages and then started to exhibit a whitish color, likely due to increasing production of reflectin proteins. We conclude from this result that the juvenile pool of reflectin is mostly produced before hatching and that maintenance of reflectin expression seems undetectable (Figs. 4F, 5F, 6F, 7F). Interestingly, this developmental process is probably reactivated during postembryonic development, because late juveniles and adults exhibit new iridophores, absent in hatchlings. For instance, we were unable to detect any reflectin expression on the ventral side of the mantle in embryos, which is consistent with the observation of Hanlon and Messenger (1988), who noted that this area shows reflective properties in *S. officinalis* adults but not in juveniles. Similarly, the fourth arm pair (future tentacles) never show expression of reflectin mRNA during development, while iridescence is visible on the tentacular club in adults (Hanlon, unpublished personal communication).

Mechanisms controlling the spatial and temporal distribution of iridophores at the organ and at the cellular level are currently totally unknown. Iridophore development has only been studied in vertebrates where the role of a melanization inhibitor factor (MIF) has been shown (Bagnara and Fukuzawa, 1990). Here, in *S. officinalis*, we remain ignorant of the molecular mechanisms that lead to isolated positive cells and to clusters, lines, or layers. The fact that these structures are already present and active before hatching suggests that the presence of iridophores is crucial for the initial camouflage patterns, yielding a better survival rate of the hatchling in a

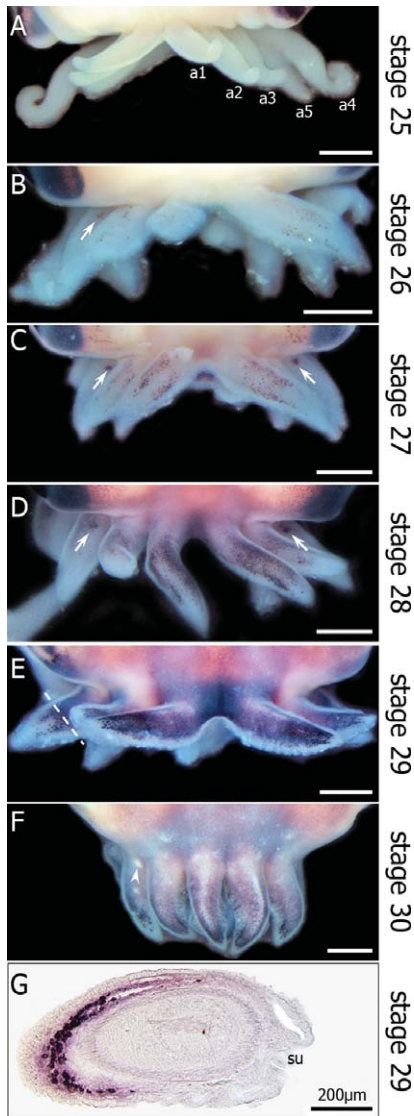


**Fig. 6.** Reflectin expression in the right eye of *S. officinalis* embryos from stage 25 to 30 as shown by whole mount in situ hybridization with AS-3. **A–F:** Reflectin expression and reflectin protein production during development of eye structures. **A:** stage 25. **B:** stage 26. **C:** stage 27. **D:** stage 28. **E:** stage 29. **F:** stage 30. **G,H:** Transverse sections of the eye. **G:** Reflectin positive cells in the iris (arrows) at stage 25 (white dotted-line in A). **H:** Reflectin positive cells in cornea (black arrows). Faded iris cells appear brown (black arrowheads), other iris cells show a light staining (white arrow) at stage 29 (white dotted-line in E). Scale bars = 500  $\mu\text{m}$  in A–F, 200  $\mu\text{m}$  in G–H. cr, crystalline lens; ir, iris; re, retina; co, cornea. Dorsal is up, ventral is down.

hostile environment. With regard to the iridescent patterning, it must be determined how new iridophores appear: they could be progeny of posi-

tive cells or naive neighboring cells recruited to express reflectin genes. Finally, our results raise the question of the turnover of reflectins throughout

the life of the animal. We currently don't know if an iridophore that has stopped producing mRNAs is able to resume reflectin mRNA and protein



**Fig. 7.** Reflectin expression on arms in *S. officinalis* embryos from stage 25 to 30 as revealed by whole mount in situ hybridization with AS-3. **A–F:** Gradual apparition of numerous positive isolated cells and clusters (white arrows) on the whole arm surface. **G:** Transverse section of arms stage 29 (white dotted-line in E). Reflectin positive cells are located at the outer side of the arms. Scale bars = 1 mm in A–F, 200  $\mu$ m in G. su: sucker. Posterior is up. Anterior is down.

expression. The iridescent areas can be maintained either by the assembling of new iridosomes in previously established iridophores or by the replacement of iridophores themselves. Our study is a first step in describing reflectin expression in *S. officinalis* and further questions about reflectin dynamics and distributions will now require more specific protocols to increase our knowledge of this unique cephalopod-specific protein family.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Biological Material

The experimental procedures were carried out in strict compliance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and followed the French legislation requirements (decree 87/848) regarding the care and use of laboratory animals. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

### Embryo collection

Eggs from *S. officinalis* were collected from the marine station of Luc-surmer (Caen University, France) between April and September 2011. Eggs were kept during development in oxygenated seawater at 20°C. In these conditions, organogenesis occurred in 2 to 3 weeks, giving rise to a juvenile identical to the adult. Embryos developed inside a chorion enclosed in numerous dark envelopes (capsule), and were sampled daily to assemble a complete collection of morphological steps according to the developmental landmarks established by Lemaire (1970). After removing the capsule and chorion, embryos were fixed and processed for in situ hybridization and RNA extraction.

### Adult tissue

The mantle tissues of dead animals from fisheries were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

### DNA Extraction of Adult Tissue

DNA extraction was performed with approximately 30 mg of mantle tissue of adult *Sepia officinalis*, stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , using DNeasy Tissue Kit (QIAGEN).

### RNA Extraction and cDNA Synthesis

Dechorionated embryos of stages 20 to 29 were immersed in RNAlater (Ambion, Austin, TX) after anesthesia by progressive temperature lowering on ice and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Total RNA from each *S. officinalis* embryos was extracted using Tri Reagent (MRC, Cincinnati, OH). After

addition of chloroform/isoamyl alcohol (24:1) and centrifugation at 12,000 rpm for 15 min, RNA was purified with RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to manufacturer's instructions. Total RNA was assembled by mixing 2  $\mu$ g of total RNA of each *S. officinalis* embryonic stage. cDNA was synthesized using 2  $\mu$ g of this total RNA pool and a Omniscript Reverse Transcription First-strand cDNA synthesis Kit (Qiagen). cDNA was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Cloning of Reflectin Genes and cDNA

Specific primers (Supp. Table S3) were designed according to the TCs (tentative contigs) obtained from an ESTs library (Genoscope CEA project) built from *Sepia* embryo cDNA (Basaglia et al., 2012).

PCRs were performed as follows: an initial step of polymerase activation for 5 min at  $92^{\circ}\text{C}$ ; 40 cycles with 1 min denaturation at  $92^{\circ}\text{C}$ , 1 min annealing at  $64^{\circ}\text{C}$  for, 1 min extension at  $72^{\circ}\text{C}$ , and a single final extension step of 5 min at  $72^{\circ}\text{C}$ .

The amplicons were cloned into TOPO 4 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) and sequenced by GATC Biotech (Konstanz, Germany).

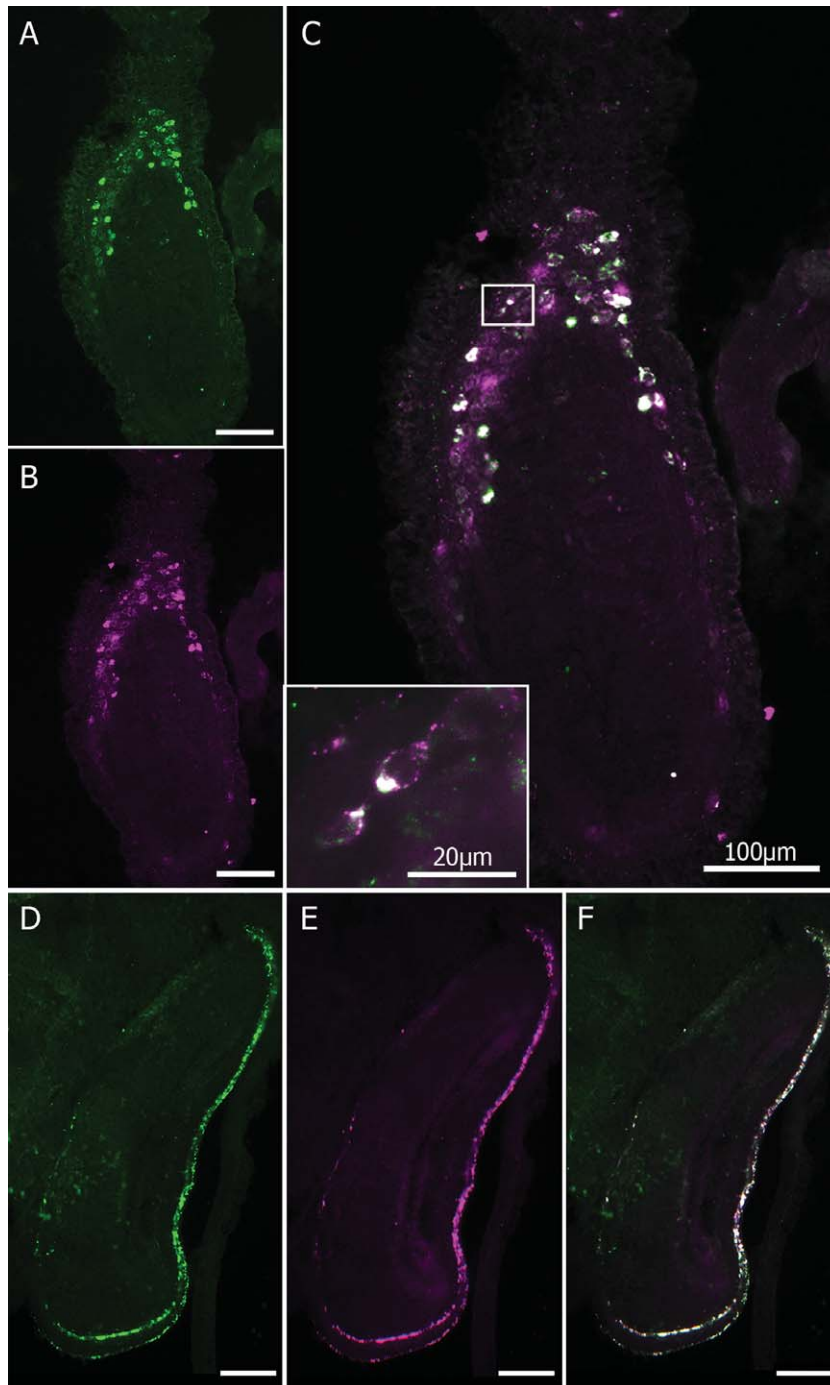
### Sequence Analysis

All alignments were done using MEGA 5.0 software (Tamura et al., 2011) and percentage identity calculations were done using Jalview 2 (Waterhouse et al., 2009). For each pair of sequences, the best global alignment is found using BLOSUM62 as a scoring matrix. The scores reported are the raw scores. The sequences are aligned using a dynamic programming technique and using the following gap penalties: Gap open: 12, Gap extend: 2. The *Sepia officinalis* reflectins sequences were registered to GenBank (Supp. Table S4).

### Whole-Mount In Situ Hybridization

#### Embryo fixation

Capsule and chorion were removed in seawater and embryos were anesthetized by progressive lowering the temperature on ice. Embryos at stage 24 to



**Fig. 8.** Double fluorescent in situ hybridization on embryonic sections from stage 26. **A–C:** Arm section. **D–F:** Eye section. Green staining: hybridization with AS-3 probe (A,D). Magenta staining: hybridization with AS-5 probe (B,E). Overlapping of the two signals appears in white (C,F). White box: detail from box in C. Scale bars = 100  $\mu\text{m}$ . Insert scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .

30 were selected and fixed in 3.7% paraformaldehyde (PFA) in filtered seawater at room temperature, for 2 to 3 hr (depending on the stage). After four rinses in phosphate buffered saline (PBS) at room temperature, embryos were placed in 30% glycerol/PBS for 2 hr at room temperature, and trans-

ferred in 50% glycerol overnight at 4°C. They were stored at –20°C until use.

#### RNA probes

RNA probes AS-3, S-3 (from *SoRef3*), AS-5, S-5 (from *SoRef5*), and AS-6, S-6 (from *SoRef6*) were generated from

cloned PCR products (Supp. Table S5), by in vitro transcription using digoxigenin-11-UTP (Dig RNA labeling mix kit, Roche, Meylan, France) or fluorescein-12-UTP (Fluorescein RNA labeling mix kit, Roche, Meylan, France). Antisense and sense probes were obtained with T3 or T7 polymerase (Roche). RNA probes were purified by cold precipitation with lithium chloride and anhydrous alcohol. Sense RNA probes were used as negative controls.

#### NBT-BCIP in situ hybridization

ISH was performed using at least three embryos per stage and controls were done for each stage. All steps were performed at room temperature unless stated otherwise. After five rinses in PTW (PBS, 0.1% Tween 20), embryos were permeabilized by proteinase K (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PTW for 20 min) and post-fixed 1 hr in 3.7% PFA. Embryos were then prehybridized for 6 hr at 65°C in hybridization solution (SH) (50% formamide, 5X standard saline citrate [SSC], 0.1% Tween 20, 1% sodium dodecyl sulfate) containing 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  heparin and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  baker's yeast tRNA (Roche). Hybridization with RNA probes (300 ng/ml) were done in hybridization buffer (SH, 33  $\mu\text{g}/\text{ml}$  heparin, 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  tRNA) at 65°C overnight. Unbound probes were removed by 4 washes in SH, one in 25% 2X SSC in SH, one in 50% 2X SSC in SH, one in 75% 2X SSC in SH, one in 2X SSC, each 10 min at 65°C. All washing solutions were prewarmed at 65°C.

Hybridized probes were detected by an anti-digoxigenin antibodies coupled with alkaline phosphatase (Roche). After a saturation step in 4% blocking reagent (Roche) and 15% fetal bovine serum in MABT (Maleic acid 100 mM and NaCl 150 mM, pH 7.5, 1% Tween20) for 1 hr at room temperature, embryos were incubated overnight at 4°C with antibodies diluted 1:2,000 in MABT containing 1% blocking reagent (Roche) and 5% fetal bovine serum. Embryos were washed six times in MABT for 10 min, and bound antibodies were revealed using NBT-BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate; Roche) substrate in alkaline phosphatase solution (Tris-

HCl pH 9.5 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.1% Tween20) prepared fresh and containing 1 mM levamisol, at room temperature for 3 hr. The reaction was stopped by washing in PTW solution. Embryos were post-fixed 24 hr in 3.7% PFA in PBS.

#### *Fluorescent in situ hybridization*

In situ hybridization was performed using at least 3 embryos per stage and controls were done for each stage. Hybridization and washes were as described before, but RNA probes were detected by anti-digoxigenin antibodies coupled with horseradish peroxidase (POD) (Roche). Inactivation of endogenous peroxidase activity was done by incubation in PTW with 3% hydrogen peroxide for 30 min at room temperature. After 1 wash in MABT for 5 min, a saturation step in 4% blocking reagent (Roche) and 15% fetal bovine serum in MABT for 1 hr at room temperature was performed. Then, embryos were incubated overnight at 4°C with antibodies diluted 1:500 in MABT containing 1% blocking reagent (Roche) and 5% fetal bovine serum. Embryos were washed three times in PTW for 10 min, and bound antibodies were revealed using fluorescein isothiocyanate (FITC)-tyramide (synthesized in the laboratory) diluted 1:200 in PTW containing 0.001% hydrogen peroxide at room temperature for 45 min in the dark.

The reaction was stopped by washing in PTW solution and embryos were post-fixed 24 hr in 3.7% PFA in PBS.

#### **Double Fluorescent In Situ Hybridization on Cryostat Sections**

##### *Cryosection*

Embryos were embedded in gelatin/saccharose phosphate solution (phosphate buffer 0.12 M, 12% saccharose, 7.5% gelatin) and then rapidly frozen in liquid isopentane at -80°C. They were cut in 20 µm sections on a Microm Microtech cryostat (HM560).

##### *Double fluorescent in situ hybridization*

ISH was performed using sections at different levels of 3 embryos (stage 26)

in independent experiments. Controls were done for each manipulation. This protocol was adapted from Braissant and Wahli (1998). After defrosting 30 min at room temperature, sections were incubated for 2 × 15 min in PBS containing 0.1% active DEPC (Sigma), and equilibrated for 15 min in 5X SSC. The sections were then prehybridized for 2 hr at 65°C in the hybridization buffer (50% formamide, 5X SSC, salmon sperm DNA 40 µg/ml, 5X Denhardt's reagent, 10% dextran sulphate). A mix of digoxigenin and fluorescein labeled probes was added to hybridization buffer (each 300 ng/ml). Hybridization was carried out at 65°C overnight. Prehybridization and hybridization were performed in a humidified chamber saturated with a 5X SSC/50% formamide solution to avoid evaporation. After incubation, the sections were washed for 30 min in 2X SSC, 1 hr in 2X SSC, 1 hr in 0.1X SSC at 65°C. All washing solutions were prewarmed at 65°C. Inactivation of endogenous peroxidase activity was performed in PTW with 3% hydrogen peroxide for 30 min at room temperature. After 1 wash in MABT for 5 min, a saturation step in 4% blocking reagent (Roche) and 15% fetal bovine serum in MABT for 1 hr at room temperature was performed. Then, sections were incubated overnight at 4°C with POD-coupled anti-digoxigenin antibodies (Roche) diluted 1:500 in MABT containing 1% blocking reagent (Roche) and 5% fetal bovine serum. Sections were washed three times in PTW for 10 min, and bound antibodies were revealed using Cy3-tyramide diluted 1:200 in PTW containing 0.001% of hydrogen peroxide, at room temperature for 45 min, in the dark. Future steps take place in the dark. The revelation was stopped and any residual peroxidase activity was quenched by washing in PTW with 3% hydrogen peroxide for 30 min. After a new step of saturation for 1 hr, incubation with anti-Fluorescein antibodies coupled with POD, was performed overnight at 4°C. After washing off unbound antibodies, the second color step was performed with FITC-tyramide diluted 1:200 in PTW containing 0.001% hydrogen peroxide at room temperature for 45 min. After washing, the sections were mounted in Mowiol.

#### **Observation and Imaging**

Embryos were observed with a Leica M16 2F binocular stereomicroscope and sections were observed with a Leica DMLB microscope. Color pictures were made with a Coolsnap, color camera, and fluorescent pictures were made with a Qimaging Retiga 2000R black and white camera and colorized in Adobe Photoshop CS (Adobe Systems, San Jose, CA).

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank J. Henry and L. Dickel (University of Caen), S. Henry, L. Lévêque and X. Bailly (Roscoff Biology Station - UPMC) for providing biological materials. We thank R. Hanlon for unpublished information. We thank Annabelle Aish (SPN - MNHN) and Caroline B. Albertin (University of Chicago) for helpful English corrections on the article. The Sepia EST library was obtained in collaboration with Corinne Da Silva and Julie Poulain (CEA Genoscope).

#### **REFERENCES**

- Arnold JM, Young RE, King MV. 1974. Ultrastructure of a cephalopod photophore. I. Iridophores as reflectors and transmitters. *Biol Bull* 147:522-534.
- Bagnara JT, Fukuzawa T. 1990. Stimulation of cultured iridophores by amphibian ventral conditioned medium. *Pigment Cell Res* 3:243-250.
- Bandaranayake WM. 2006. The nature and role of pigments of marine invertebrates. *Nat Prod Rep* 23:223-255.
- Barbosa A, Mäthger LM, Chubb C, Florio C, Chiao CC, Hanlon RT. 2007. Disruptive coloration in cuttlefish: a visual perception mechanism that regulates ontogenetic adjustment of skin patterning. *J Exp Biol* 210:1139-1147.
- Bassaglia Y, Bekel T, Da Silva C, Poulain J, Andouche A, Navet S, Bonnaud L. 2012. ESTs library from embryonic stages reveals tubulin and reflectin diversity in *Sepia officinalis* (Mollusca - Cephalopoda). *Gene* 498:203-211.
- Boletzky Sv, Erlwein B, Hofmann DK. 2006. The Sepia egg: a showcase of cephalopod embryology. *Vie Milieu Life Environ* 56:191-201.
- Braissant O, Wahli W. 1998. A simplified in situ hybridization protocol using non-radioactively labeled probes to detect abundant and rare mRNAs on tissue sections. *Biochemica* 1:10-16.
- Chiao CC, Hanlon RT. 2001. Cuttlefish camouflage: visual perception of size, contrast and number of white squares on artificial checkerboard substrata initiates disruptive coloration. *J Exp Biol* 204:2119-2125.

- Chiou TH, Mäthger LM, Hanlon RT, Cronin TW. 2007. Spectral and spatial properties of polarized light reflections from the arms of squid (*Loligo pealeii*) and cuttlefish (*Sepia officinalis* L.). *J Exp Biol* 210:3624–3635.
- Cloney RA, Florey E. 1968. Ultrastructure of cephalopod chromatophore organs. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 89:250–280.
- Cloney RA, Brocco SL. 1983. Chromatophore organs, reflector cells, iridocytes and leucophores in cephalopods. *Am Zool* 23:581–592.
- Cooper KM, Hanlon RT. 1986. Correlation of iridescence with changes in iridophore platelet ultrastructure in the squid *Lolliguncula brevis*. *J Exp Biol* 121:451–455.
- Cooper KM, Hanlon RT, Budelmann BU. 1990. Physiological color change in squid iridophores. II. Ultrastructural mechanisms in *Lolliguncula brevis*. *Cell Tissue Res* 259:15–24.
- Crookes WJ, Ding LL, Huang QL, Kimbell JR, Horwitz J, McFall-Ngai MJ. 2004. Reflectins: the unusual proteins of squid reflective tissues. *Science* 303:235–238.
- Denton EJ, Land MF. 1971. Mechanism of reflexion in silvery layers of fish and cephalopods. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 178:43–61.
- Dubas F. 1987. Innervation of chromatophore muscle fibres in the octopus *Eleuthero cirrhosa*. *Cell Tissue Res* 248:675–682.
- Florey E. 1969. Ultrastructure and function of cephalopod chromatophores. *Am Zool* 9:429–442.
- Fox DL. 1953. Animal biochromes and structural colours. Cambridge: Cambridge University Press.
- Gaston MR, Tublitz NJ. 2006. Central distribution and three-dimensional arrangement of fin chromatophore motoneurons in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Invert Neurosci* 6:81–93.
- Hanlon RT. 1982. The functional organization of chromatophores and iridescent cells in the body patterning of *Loligo plei* (Cephalopoda: Myopsida). *Malacologia* 23:89–119.
- Hanlon R. 2007. Cephalopod dynamic camouflage. *Curr Biol* 17:R400–R404.
- Hanlon RT, Messenger JB. 1988. Adaptive coloration in young cuttlefish (*Sepia officinalis* L.): the morphology and development of body patterns and their relation to behaviour. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 320:437–487.
- Hanlon RT, Messenger JB. 1996. Cephalopod behaviour. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Hanlon RT, Cooper KM, Budelmann BU, Pappas TC. 1990. Physiological color change in squid iridophores. I. Behavior, morphology and pharmacology in *Lolliguncula brevis*. *Cell Tissue Res* 259:3–14.
- Hanlon RT, Chiao CC, Mäthger LM, Barbosa A, Buresch KC, Chubb C. 2009. Cephalopod dynamic camouflage: bridging the continuum between background matching and disruptive coloration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364:429–437.
- Holt AL, Sweeney AM, Johnsen S, Morse DE. 2011. A highly distributed Bragg stack with unique geometry provides effective camouflage for Lolliginid squid eyes. *J R Soc Interface* 8:1386–1399.
- Izumi M, Sweeney AM, Demartini D, Weaver JC, Powers ML, Tao A, Silvas TV, Kramer RM, Crookes-Goodson WJ, Mäthger LM, Naik RR, Hanlon RT, Morse DE. 2010. Changes in reflectin protein phosphorylation are associated with dynamic iridescence in squid. *J R Soc Interface* 7:549–560.
- Kelman EJ, Baddeley RJ, Shohet AJ, Osorio D. 2007. Perception of visual texture and the expression of disruptive camouflage by the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Proc Biol Sci* 274:1369–1375.
- Kramer RM, Crookes-Goodson WJ, Naik RR. 2007. The self-organizing properties of squid reflectin protein. *Nat Mater* 6:533–538.
- Land MF. 1972. The physics and biology of animal reflectors. *Prog Biophys Mol Biol* 24:75–106.
- Lemaire J. 1970. Table de développement embryonnaire de *Sepia Officinalis* L. (Mollusque Cephalopode). *Bull Soc Zool France* 95:773–782.
- Mäthger LM, Denton EJ. 2001. Reflective properties of iridophores and fluorescent 'eyespot' in the loliginid squid *Alloteuthis subulata* and *Loligo vulgaris*. *J Exp Biol* 204:2103–2118.
- Mäthger LM, Hanlon RT. 2006. Anatomical basis for camouflaged polarized light communication in squid. *Biol Lett* 2:494–496.
- Mäthger LM, Collins TFT, Lima PA. 2004. The role of muscarinic receptors and intracellular Ca<sup>2+</sup> in the spectral reflectivity changes of squid iridophores. *J Exp Biol* 207:1759–1769.
- Mäthger LM, Denton EJ, Marshall NJ, Hanlon RT. 2009a. Mechanisms and behavioural functions of structural coloration in cephalopods. *J R Soc Interface* 6:S149–S163.
- Mäthger LM, Shashar N, Hanlon RT. 2009b. Do cephalopods communicate using polarized light reflections from their skin? *J Exp Biol* 212:2133–2140.
- Mirow S. 1972a. Skin color in the squids *Loligo pealii* and *Loligo opalescens*. I. Chromatophores. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 125:143–175.
- Mirow S. 1972b. Skin color in the squids *Loligo pealii* and *Loligo opalescens*. II. Iridophores. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 125:176–190.
- Packard A, Hochberg F. 1977. Skin patterning in octopus and other genera. In: The biology of cephalopods, camouflage. Nixon M, Messenger JB, eds. New York: Academic Press. p 191–231.
- Shashar N, Hanlon RT. 1997. Squids (*Loligo pealei* and *Euprymna scolopes*) can exhibit polarized light patterns produced by their skin. *Biol Bull* 193:207–208.
- Shashar N, Hagan R, Boal JG, Hanlon RT. 2000. Cuttlefish use polarization sensitivity in predation on silvery fish. *Vision Res* 40:71–75.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739.
- Tao AR, DeMartini DG, Izumi M, Sweeney AM, Holt AL, Morse DE. 2010. The role of protein assembly in dynamically tunable bio-optical tissues. *Biomaterials* 31:793–801.
- Vukusic P, Sambles JR. 2003. Photonic structures in biology. *Nature* 424:852–855.
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. 2009. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25:1189–1191.
- Weiss JL, Evans NA, Ahmed T, Wrigley JDJ, Khan S, Wright C, Keen JN, Holzenburg A, Findlay JBC. 2005. Methionine-rich repeat proteins: a family of membrane-associated proteins which contain unusual repeat regions. *Biochim Biophys Acta* 1668:164–174.

Article n°5

Bassaglia, Y., Buresi, A., Franko, D., Andouche, A., Baratte, S. & Bonnaud, L. (2013). *Sepia officinalis*: A new biological model for eco-evo-devo studies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 447:4-13





## Special issue: Cephalopod Biology

*Sepia officinalis*: A new biological model for eco-evo-devo studies <sup>☆</sup>Yann Bassaglia <sup>a,c,\*</sup>, Auxane Buresi <sup>a</sup>, Delphine Franko <sup>a,b</sup>, Aude Andouche <sup>a</sup>, Sébastien Baratte <sup>a,d</sup>, Laure Bonnaud <sup>a,b</sup><sup>a</sup> Muséum National d'Histoire Naturelle, DMPA, Lab. BOREA., UMR MNHN CNRS 7208-IRD 207-UPMC, France<sup>b</sup> Univ. Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France<sup>c</sup> Univ. Paris Est Créteil-Val de Marne (UPEC), Paris, France<sup>d</sup> Univ. Paris Sorbonne, Paris 4, Paris, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 December 2011

Received in revised form 17 July 2012

Accepted 25 January 2013

## Keywords:

Adaptation  
Cephalopod  
Evo-devo  
Model

## ABSTRACT

Lophotrochozoans are largely under-represented in 'eco-evo-devo'. We aim to understand the evolution of cephalopods, a highly derived group in molluscan clade, in the light of the selective pressures that may be induced from their present mode of life. *Sepia officinalis* has been chosen for its particularities: a direct development, a complex nervous system allowing elaborated body patterning, and molluscan derived characters (brachial crown and funnel derived from the foot, internal calcareous shell). These characteristics have been selected because they confer adaptive advantages for its necto-benthic mode of life.

We focus on the development of neuromuscular system that is implicated in environmental sensing to expression of complex behaviours. We study the expression during development of target genes identified using our EST library. We show that their role in *S. officinalis* is often different from those described in other species, as most genes show extended or restricted expression in the developing morphological novelties, or unexpected expression. Moreover, the nervous system – as well as the chromatophore network and the ability to perceive environment – differentiates very early and largely before the brain is constituted. These studies enlighten the particularities of molecular and physiological pathways in the cephalopod lineage. They underline the necessity to have a better evolutionary understanding of the genetic control of structure/function relationships. Genome sequencing on cephalopods – that possess the biggest genome among molluscs – appears crucial for comparative genomics in lophotrochozoan lineages. As *S. officinalis* is an ideally suitable eco-evo-devo model, we propose its genome sequencing as a priority.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

If “evolution is the control of development by ecology” (van Valen, 1973), there is a clear need to develop integrative approaches to understand the mechanisms of structure and function evolution in the light of ecological cues. Eco-evo-devo integrates the ecological context (environmental constraints and adaptation) of the organism and its development in an evolutionary perspective (Müller, 2007; Tauber, 2012). Historically, biological models belonging to ecdysozoans and vertebrates, such as *Drosophila*, *Caenorhabditis* or zebrafish, have been chosen in evo-devo studies for their possibility to be used as genetic tools (Antoshechkin and Sternberg, 2007; Guertin et al., 2010; Read 2011; Souza and Tropepe, 2011; Tobia et al., 2011). Few lophotrochozoans have been included in developmental and evolutionary studies, partly due to the lack of well-developed models, although annelids and molluscs have been used for several decades in

developmental investigations. Mollusc models are just emerging (Henry et al., 2010) in the field of “evo-devo”, and must be further exploited – especially those that present derived characters informative to approach developmental plasticity. This approach will be essential to elaborate phylogenetic hypotheses on molecular pathways underlying evolution of this lineage.

Cephalopods are now considered as valuable models in an evo-devo context for several reasons. They present anatomically convergent structures with vertebrates such as the central nervous system (CNS), the brain, and sensorial structures, such as camera eye. Their evolutionary and ecological interest is evidenced by their specificities within molluscs and the diversity of their mode of life. They belong to molluscs, but they show remarkable divergences with deep modifications of the body plan organization. By contrast with the typical molluscan design characterized by an external protective shell produced by the mantle and a muscular foot, coleoids (octopus, squids, and cuttlefishes) show an internal regressed shell and derived characters concerning the neuro-muscular complex. The brachial crown and the funnel, both derived from the molluscan foot, and the highly muscular mantle are used in the characteristic jet propulsion locomotion of cephalopods. The degree of shell reduction varies between coleoids and is interpreted as

<sup>☆</sup> This article is part of a special issue on Cephalopod Biology published under the auspices of CephRes-ONLUS ([www.cephalopodresearch.org](http://www.cephalopodresearch.org)).

\* Corresponding author.

E-mail address: [bassaglia@mnhn.fr](mailto:bassaglia@mnhn.fr) (Y. Bassaglia).

the result of a convergent evolution throughout cephalopods (Kröger et al., 2011). In terms of fitness, the external shell could not have been lost without any concomitant anatomical, neural, or behavioural adaptation. In particular the disappearance of this external protective layer uncovers the mantle and allows the use of chromatophores – neuromuscular colour-changing organs of the skin – not only to escape predators by camouflage but also to create complex and rich intraspecific communications (Hanlon and Messenger, 1996). How it is possible to evolve from an ancestral mollusc through an ancestral cephalopod, and which mechanisms have been selected during evolution, are crucial points in the understanding of cephalopod lineage characteristics. Moreover, the different biotopes occupied by coleoids (pelagic: squids; benthic: octopus; necto-benthic: cuttlefishes) illustrate a large range of selective pressures and allow pertinent comparison in this group.

As stated before, eco-evo-devo studies try to investigate the evolutionary (long term) axis under the light of an historical perspective (short term ecological responses of individuals to environmental cues). Determining developmental genes implicated in the setting-up of derived characters such as internal shell, arms and funnel, muscular mantle and nervous system allows an input on the evolutionary mechanisms that have driven these adaptive changes. Unlike other molluscs, cephalopods show a direct development that allows us to follow all developmental stages and to access the molecular control without any modification due to metamorphosis. These peculiarities make the cephalopod an innovative model among lophotrochozoans and allow addressing evolutionary hypotheses concerning the emergence of these structures in relation to their life environment. We use a developmental approach in *Sepia officinalis*, considering the environment and the selective pressure that led to neuromuscular adaptations for locomotion and camouflage functions.

## 2. *S. officinalis*, a biological model in eco-evo-devo

The cuttlefish, *S. officinalis*, is an economically important species interesting to aquaculture (Pierce et al., 2010), and a particularly suitable model in such an integrative approach. *S. officinalis* is necto-benthic, with an “intermediate” mode of life, and possesses not only giant fibres allowing efficient propulsion – like the pelagic squids – but also numerous chromatophores to hide or communicate like the benthic octopuses. The calcified shell of *S. officinalis* is internal and assists the animal in locomotion by facilitating buoyancy. From the practical side, *S. officinalis* eggs are voluminous, easily collected and maintained in laboratory-controlled conditions. The embryogenesis of *S. officinalis* has been accurately described (Boletzky, 2006; Lemaire, 1970; Naef, 1928). Moreover, there is an extensive knowledge of adult and juvenile nervous systems (Boycott, 1961) and body-colour patterning, which has been studied as soon as hatching occurs (Barbosa et al., 2007; Hanlon and Messenger, 1988).

### 2.1. Development and organogenesis

The life span of *S. officinalis* does not exceed two years. Females undergo just one reproductive round and die shortly after. In the field, eggs are laid near the coast in spring. Particularly, in the English Channel and Atlantic Ocean, they may be exposed to air and/or desalinated rainwater due to daily tides. Eggs are attached in batches and surrounded by thick black gelatinous envelopes (capsule) potentially protecting the embryo from environmental aggressions.

The development of all cephalopods, including *S. officinalis*, is direct: the adult bauplan is achieved with neither visible larval stage nor metamorphosis event within the egg capsule (Boletzky, 2006). After 3–4 weeks (at 25 °C in the laboratory), a young cuttlefish hatches and promptly adopts the adult necto-benthic mode of life (Fig. 1, left). Within the egg capsule the zygote cleavage gives rise to a disk-shaped embryo at the animal pole of the telolecithal egg, whereas the vegetal pole shows a thin layer of ‘extra-embryonic’ ectoderm cells that cover

the yolk. The first organs start delineating when the animal pole is shaped as a disk (from stages 15 to 19, based on Lemaire's system, 1970). The arms and mouth are located at the periphery while the mantle is central (Fig. 1A, left). Then, the embryo expands (stages 19 to 21) and the future adult antero-posterior axis clearly appears (stage 22 to hatching) as the mantle and the whole visceral mass tip out while the arm crown and the head still face the yolk mass (Fig. 1A, right).

Besides these drastic changes of embryonic orientation, the cuttlefish development is a convenient model among molluscs. The development of adult tissues and organs can be followed throughout the embryogenesis without any kind of final “metamorphic disruption”. The typical molluscan regions (head, foot and mantle) can be easily located (Fig. 1B). The nervous system emerges as distant ganglia (Fig. 1C, left), some of them later merge and fuse into the central nervous system (i.e., the “brain”, Fig. 1C, right). Similarly, muscle tissues differentiate early and can be studied throughout the development of muscular organs (Fig. 1D). In early stages, the embryonic mantle invaginates and delineates a circular inner ‘shell sac’ (Boletzky, 2006). This cavity grows in size during stages 17 to 19; its aperture at the mantle surface decreases in size and becomes a small pore at stage 20. Then the enclosed ‘shell sac’ starts producing both the organic matrix of the shell and a periostracum and the calcification starts at stage 24. A progressive colouration of the eyes and the skin is acquired concomitantly from stages 24–25.

### 2.2. Cellular and molecular data

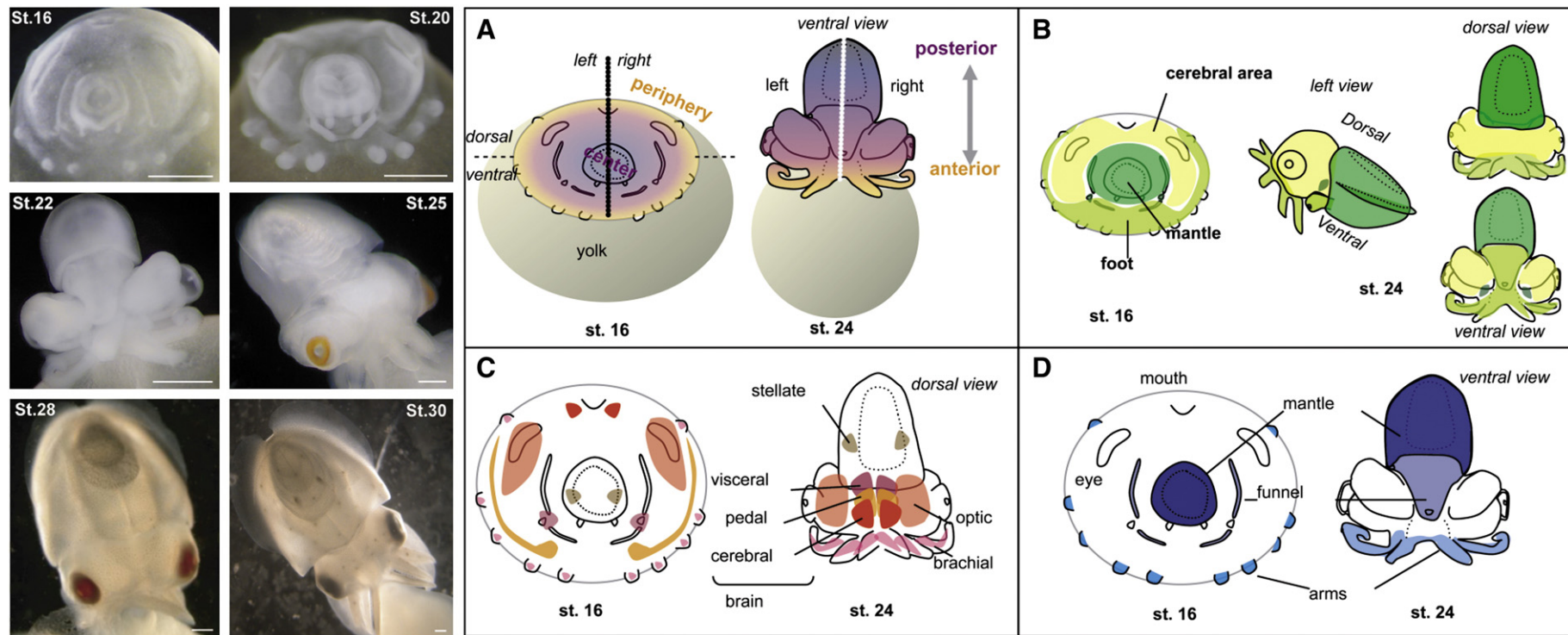
If the morphological description as a whole is well established, histological description of *S. officinalis* development is rather scarce, and cellular events are poorly understood. Molecular data are just emerging for cephalopods, and there is no cephalopod genome assembly currently available. Even the number of chromosomes is very difficult to observe in somatic cells of cephalopods (Vitturi et al., 1990). Using germ line cells, Vitturi et al. (1990) reported a haploid content of 52 or 56 chromosomes in *S. officinalis*, a number compatible with the  $2n=92$  chromosomes observed in *Sepia esculenta* or *Sepia lycidas* by Gao and Natsukari (1990). The huge estimated size of cephalopod genome (e.g., about 4 Gb in *S. officinalis*, L. Bonnaud unpublished; 3.9 Gb in *Octopus bimaculatus*, after the DNA content data by Hinegardner, 1974) is probably due to whole genome duplication event(s) (Hallinan and Lindberg, 2011; Yoshida et al., 2011) and has prevented any whole genome sequencing effort until the so-called new generation sequencing techniques became available.

Expressed sequence tag (EST) libraries of specific organs in adult or juvenile cephalopods have been developed, the largest being from juvenile light organ of *Euprymna scolopes* (Chun et al., 2006; Table 1). The only EST library available for cephalopod embryos has been recently developed from pools of whole *S. officinalis* embryos (stages 16–28, sensu Lemaire, 1970), thus covering all major steps of organogenesis (Bassaglia et al., 2012).

A set of 19,780 non-redundant sequences were obtained in this study, but 75% of these sequences presented no clear homology after automatic annotation. Nevertheless, the comparison with the number of genes suggested by whole genome sequencing in other lophotrochozoan species, as well as the over-all structure of KOG annotations, indicates that this set obtained from whole embryo probably come closer to whole genome sequence as for other published studies. Using these data, homologous genes, known in other metazoans to have a role in the neuro-muscular complex development, can be conveniently detected and tested in cephalopods.

## 3. Myogenesis, particular muscle system and molecular control of myogenesis: selective pressure on locomotory structures

Different histological types of muscles are described in molluscs (Millman, 1967). Notably, a third class, obliquely striated muscle is



**Fig. 1.** Main features of *Sepia officinalis* anatomy and development. Left: pictures of *Sepia* embryos at stages 16, 20 ('centre view'), 22 (ventral view), 25, 28 and 30 near hatching (dorsal view). Scale bar: 1 mm. Right A–D: an illustrated overview of *Sepia officinalis* organogenesis illustrating the modification of body plan and the main structures. A: orientation of anterior–posterior axis; B: mollusc typical body plan; C: nervous territories; D: muscular territories.

**Table 1**

A tabularized overview of the currently available EST libraries from specific organs of adult or juvenile cephalopods.

	ESTs	Organ/stage	References
<i>Sepia officinalis</i>	43,672	Embryos (stages 16–28)	Bassaglia et al. (2012)
<i>Euprymna scolopes</i>	35,420	Juvenile (light organ)	Chun et al. (2006)
<i>Loligo pealei</i>	22,689	Stellate ganglia	DeGiorgis et al. (2011)
<i>Loligo bleekeri</i>	768	Liver	Kondo et al. (2010); see also Yoshida and Ogura (2011)
<i>Octopus vulgaris</i>	16,432	Eye	Ogura et al. (2004)

present in addition to the classical smooth and cross striated muscles also known in vertebrates. Almost all muscles in cephalopods are obliquely striated, but cross striated muscles have also been described in tentacles (Kier, 1985; 1991; Kier and Schachat, 2008; Kier and Thompson, 2003). The presence of this type of muscle in the systemic heart is discussed (Budermann et al., 1997; Kling and Schipp, 1987; Schipp and Schafer, 1969).

In vertebrates, skeletal cross-striated muscle development relies on Myogenic Regulatory Factors (MRF), a highly conserved family of four transcription factors: MyoD, myf-5, myogenin and MRF4 (myf-6) (for review see: Bentzinger et al., 2012; Buckingham et al., 2003; Tapscott, 2005). Using vertebrate anti-MRF antibodies, Grimaldi et al. (2004a, 2004b) have shown myf5- and MyoD-like positive staining in muscle cells of arms and tentacles in *S. officinalis* embryo from stage 26 to hatching. Interestingly, only one MRF (sca\_11:2291180-2291458) is annotated in the gastropod *Lottia gigantea* genome assembly (accessible at the JGI web site), in accordance with the hypothesis of a genome duplication in cephalopods. Unfortunately, we were unable to detect any MRFs in *S. officinalis* ESTs.

Other transcription factors are known to be involved in myogenesis. In vertebrate embryos, Pax3 and Pax7 genes are widely expressed in somites – where they act upstream of the MRFs and play distinct roles in skeletal muscle development (Bentzinger et al., 2012; Buckingham and Relaix, 2007). Pax3/7 has just been characterized in our *Sepia* EST library, but its involvement in muscles setting up, if any, has not yet been evidenced (data not shown).

The development of cardiac muscle, a specific type of striated muscle in vertebrates, depends on numerous different transcription factors (review in: Brand, 2003; Bruneau, 2002; Buckingham et al., 2005; Olson, 2006), such as NK4. NK4 gene homologues have been identified in numerous species (Elliott et al., 2006; Harvey, 1996). The vertebrate NK4 homologue, Nkx2-5 (Lints et al., 1993), is implicated in heart development (review in: Akazawa and Komuro, 2005; Olson, 2006). In cephalopods, NK4 homologue expression in the systemic heart and the adjacent muscular ink sac of *Loligo paelii* has been revealed in one late embryonic stage (Elliott et al., 2006). During *S. officinalis* organogenesis, SoNK4 is expressed in structures known to be particularly rich in muscles, first in arms, mantle and, in later stages, funnel tube primordia (Navet et al., 2008). Interestingly, the funnel pouch primordia remains negative for NK4 in accordance with the classical view of a different embryological origin for the two parts of the funnel (Boletzky, 1988). All these structures belong to the muscular hydrostat and are involved in locomotion by jet propulsion (Kier, 1989; Kier and Thompson, 2003).

NK4 could have been recruited in cephalopods for the emergence of morphological novelties implicated in the locomotory function useful to escape, in the absence of a protective shell. In vertebrates, no expression of NK4/Nkx2.5 is detected in locomotory muscles but, notably, the only muscular extra-cardiac expression of NK4/Nkx2.5 occurs in arch-derived pterygoid muscle (Kasahara et al., 1998). These muscles belong to the craniofacial muscle, a morphological novelty of jawed

vertebrate with a specific myogenic regulatory strategy (Sambasivan et al., 2011).

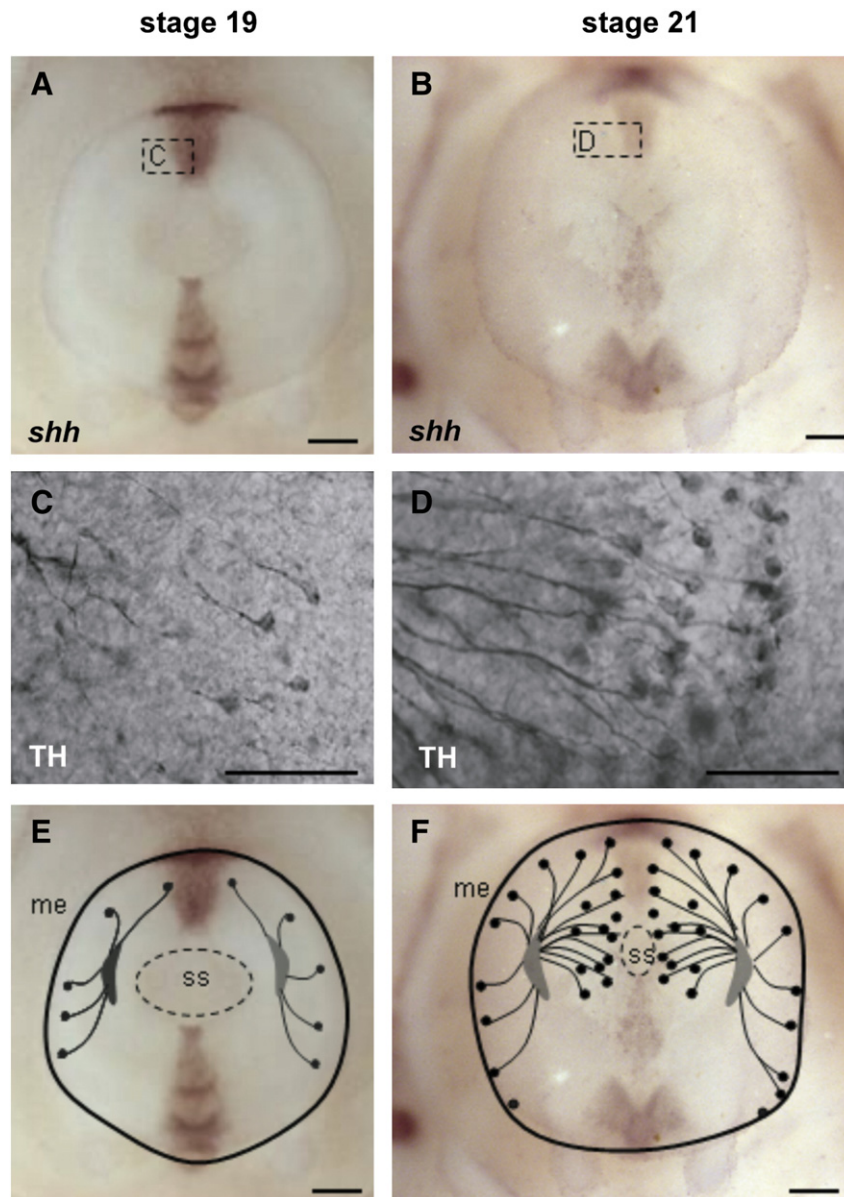
#### 4. Molecular control of neurogenesis: selective pressure on sensory structures

From an evolutionary point of view, the study of dopaminergic system is interesting in cephalopods because *i.* cephalopods are the only non-vertebrates to produce important quantity of serotonin, dopamine, and noradrenalin (Juorio, 1971; Messenger, 1996), *ii.* both antagonistic serotonergic and dopaminergic systems are essential in the control of locomotory function and movements as in mammals, and *iii.* dopamine is known to influence cell proliferation, differentiation, and neuritogenesis in the earliest developmental stages of different metazoans (Buznikov et al., 1996; McCobb et al., 1988a, 1988b; Nguyen et al., 2001; Polak et al., 1991; Price and Goldberg, 1993; Ruediger and Bolz, 2007; Spencer et al., 1998).

Dopamine (DA) and noradrenalin (NA) are present in the adult cephalopod brain (*Sepia*, *Loligo* and *Octopus*) and widely distributed across the different brain regions (Juorio, 1971; Kime and Messenger, 1990). Based on biochemical experiments, Capasso et al. (1991, 1993) were able to characterize a cephalopod dopamine system with a putative dopamine D2-like receptor. DA has been evidenced in the sensory peripheral nervous system: in the statocysts (Budermann and Bonn, 1982; Kime and Messenger, 1990; Williamson, 1989), in the olfactory organ (Lucero and Gilly, 1995) in the retina (Makman et al., 1987; Silver et al., 1983; Suzuki and Tasaki, 1983) and in the ink sac (Fiore et al., 2004).

In *Sepia* embryos, immunocytochemistry against tyrosine hydroxylase (TH), a key enzyme in the dopamine biosynthesis pathway, has evidenced a precocious differentiation of dopaminergic neurons in almost but not all ganglia of the CNS (Baratte and Bonnaud, 2009), suggesting that the dopaminergic system is settled early before the brain is constituted (Fig. 2). These results parallel those found in molluscs with veliger larvae whose early dopaminergic nervous system is able to perceive external cues inducing metamorphosis (Coon et al., 1985; Croll et al., 1997; Pechenik et al., 2002; Pires et al., 1997, 2000). In cephalopods, metamorphosis has probably been lost early after the phylum radiation. So this unexpected early dopaminergic differentiation in *Sepia* could stand either as a vestige of this ancestral system, or as a proof that embryos are still able to perceive external cues – although the environmental perception is limited by the protective capsule.

In vertebrates, the differentiation of serotonergic and dopaminergic systems is controlled upstream by sonic hedgehog (*Shh*). *Shh* belongs to the hedgehog family and is a diffusible morphogen (Ingham and McMahon, 2001). In vertebrates, *Shh* is expressed in several regions of the brain and controls some genes such as *Pax6* that has a dorsal role in the neural tube (sensory areas) and in the eyes. The *Drosophila* homologue of *Shh*, *hedgehog* is also expressed in the brain and acts upstream of *eyeless*, the *Drosophila* *Pax6* homologue (Krauss et al., 1993; Page, 2002). Studies in the gastropod *Patella vulgata* show that *shh* is expressed in the ventral cord of the trochophore larvae and in sensorial cells (Nederbragt et al., 2002). Similarly, in *S. officinalis*, *shh* is expressed in tissues surrounding the whole optic area and in the sensory peripheral nervous system, namely arms (Navet et al., 2009), statocysts and mantle, suggesting a conserved involvement in the differentiation of dopaminergic neurons. For instance, at the mantle level, *shh* is likely to intervene as a chemorepulsive molecule that prevents axons of sensory neurons to cross the midline during growth cone guidance to their correct target in the brain (Fig. 2). This repulsive role, directly or not, has been evidenced in vertebrates by showing that a morphogen, *Shh*, can act as a switch of axon guidance responses: *Shh* is able to activate the repulsive response of pre-crossing axons to semaphorins (Parra and Zou, 2010) and could maintain the axon pathfindings by multidirectional repulsion (Song et al., 2012).



**Fig. 2.** *Shh* expression (A, B) and TH immunostaining showing sensory cells (C, D) in the mantle area of *Sepia* embryos at stages 19 (left) and 21 (right). E, F: merged pictures of *shh* expression and schemes of sensory neurons networks at each stage (me: mantle edge; ss: shell sac). Scale bars: 400  $\mu$ m.

### 5. Evolutionary steps of the selected colour pattern: from development to behaviour

Body patterns imply visual structures, skin components, and are linked to the neural network. They are responsible for complex behaviours as soon as hatching occurs (Barbosa et al., 2007). They are illustrative of adaptation in short term (a pattern must match to a given situation), and evolution in long term (patterns conferring an advantage in an environment are selected during evolution).

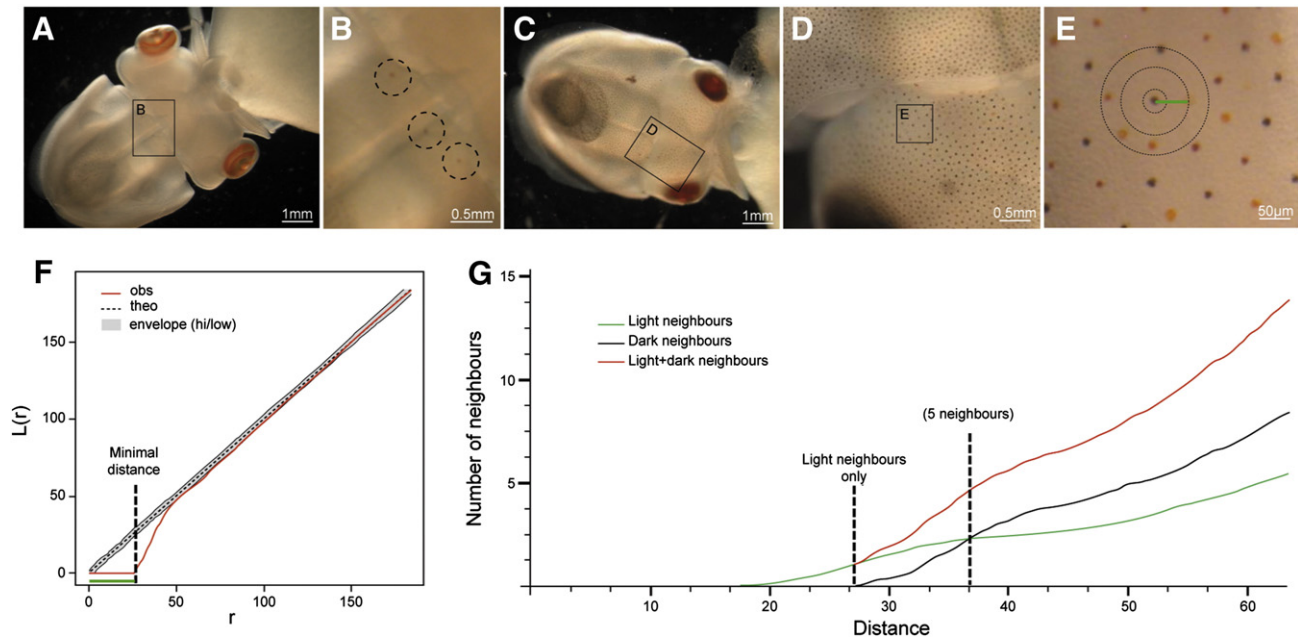
In present day living coleoid (octopus, squid and cuttlefish) skin patterning abilities, as well as a sophisticated visual system and brain, have been selected for several adaptive behaviours: predation, communication and defensive behaviour-camouflage against direct predators such as fishes, marine mammals and birds (for review see for example: Hanlon and Messenger, 1988, 1996; Messenger, 2001; Packard, 1972; Packard and Hochberg, 1977). These patterns have been studied from early juveniles to adult (e.g., Barbosa et al., 2007; Denton and Land, 1971; Hanlon et al., 2009; Hanlon and Messenger, 1988, 1996;

Masthay, 1997; Mäthger and Denton, 2001). Surprisingly, even cephalopods with an immature brain are able to change their colour pattern at least from hatching (Dickel et al., 1997, 2000). These changes are instantaneous in response to visual stimuli but also chemical and tactile inputs, hatchlings being very sensitive to any environmental variations.

#### 5.1. Coloured components of cephalopod skin

Skin colour is controlled through a combination of structures responsible for pigmentary colours, i.e., chromatophores, and structural colours, i.e., iridophores and leucophores (Messenger, 1974, 1979, 2001).

Chromatophores are neuromuscular organs under the direct control of the brain. These organs are composed of a cellular central elastic sacculus containing pigment, linked to radial muscle fibres and nerves. In adult cephalopods, up to five different colours of chromatophores are present in the skin – yellow, orange, red, brown, black – enabling presentation of complex chromatic displays. The density of chromatophores is particularly high in the dorsal skin of young cuttlefish – up to



**Fig. 3.** A, B: pictures of the first chromatophores emerging at stage 25 on the dorsal mantle edge. C, D, E: pictures of the dorsal skin of the mantle at stage 26 showing numerous chromatophores with dark and light (yellow and orange) colours. F: L-function (black) of the distribution of dark chromatophores observed on the dorsal mantle of a representative stage-30 embryo. The L-function is defined here as  $L(r) = \sqrt{\frac{K(r)}{\pi}}$ , where  $r$  is the distance, and  $K(r)$  is the Ripley's K function. The images used were not calibrated, thus  $r$  is expressed in arbitrary units (pixels). Under complete spatial randomness, e.g., for a theoretical pattern consistent with a homogenous Poisson process,  $K(r) = \pi r^2$  for any  $r$ , thus  $L(r) = r$  (theo, dotted line). An envelope of L-functions obtained from 20 generated random patterns (Poisson distributions of the same intensity as the observed pattern) is also plotted (envelope, grey zone). The L-function of the observed pattern (obs, red line) is clearly under the Poisson processes for small distances, indicating a “too regular” pattern and thus suggesting the existence of repulsion between chromatophores during ontogenesis. With longer distances, the distribution becomes rapidly undistinguishable from a random distribution. G: the mean number of neighbours of a dark chromatophore varies with the distance in vivo. The three images used were not calibrated, thus distances are expressed in arbitrary units (pixels). Images were segmented and two classes (pale and dark chromatophores) were automatically detected. For each dark chromatophore in the central area of the image, the number of neighbours belonging to each class was counted. Curves represent the mean count in function of the distance; no statistic was done in this preliminary approach. The first neighbours of a chromatophore are at a minimal distance and belong to the opposite class (green). Chromatophores of the same class appear for a higher distance (black), and become predominant over 5 neighbours. The red curve represents all the neighbours of a chromatophore.

500 per  $\text{mm}^2$  – and decreases with age (Hanlon and Messenger, 1988, 1996; Packard and Sanders, 1969).

Iridophores and leucophores are colourless cells. Iridophores contain numerous iridosomes. Iridosomes are stacks of proteinaceous platelets composed of reflectins, a cephalopod specific family of proteins, intercalated with plasma membrane folds so that the structure of an iridosome responds to multilayer reflector characteristics leading to iridescence (Arnold et al., 1974; Hanlon et al., 1990; Tao et al., 2010). Several isoforms of reflectin have been evidenced in different cephalopods (Bassaglia et al., 2012; Crookes et al., 2004; Izumi et al., 2010), but the physiological implications of this diversity are unknown. Leucophores are less understood, and the molecular content of their spherical leucosome remains to be characterized. They reflect the ambient wavelength of light and act as optically perfect diffusers (Mäthger et al., 2009).

The colour pattern depends on the proportion of coloured chromatophores that are expanded (up to  $300 \mu\text{m}$ ), on the quality of the light and on the reflection on iridophores and leucophores. Understanding the developmental setting-up of the structures responsible for the colour patterns could give insights about the mechanisms that control the final pattern and their adaptive value. The development and setting up of iridophore network are not yet established. They are functional very early, from stage 25, as iridescence is observed in the embryo (Andouche et al., 2013). Leucophores appear after hatching and are not present in the embryo. On the other hand, the development of the chromatophore network has only been studied in *Octopus* (Packard, 1985).

## 5.2. Chromatophores network ontogeny in *Sepia* embryo

As other metazoans, *S. officinalis* embryos are colourless at the beginning of the organogenesis (stage 14). The pigmentation appears

progressively from stage 25 (Fig. 3A–E). After Packard's (1985) study, the chromatophore net of *Octopus* builds up by successive waves of orange/yellow chromatophores, all chromatophores beginning as small-yellow, then growing and turning reddish-brown, and eventually becoming larger black chromatophores. A recent study on fin regeneration in *Sepia* has questioned these observations (Yacob et al., 2011). Three independent dynamics of colour maturation have been observed, from orange to yellow or reddish-brown or black, suggesting different stem populations. Furthermore, an increase of size was only observed in black chromatophores (Yacob et al., 2011). In *Sepia* embryos, chromatophores are small and their density increases very rapidly in all the body areas in the same time the animal grows until hatching (stage 30). Unfortunately, no specific gene of chromatophore organ has been yet characterized, preventing any unambiguous identification of chromatophore before the colour appears. The existence of waves of colour and the maturation of the pigments in relation to the position of the chromatophore remain to be determined.

A search for a regular pattern of coloured chromatophores can be done using distance methods for point patterns. In this context, the K-function introduced by Ripley (1977) is particularly useful for testing complete spatial randomness. This function and its derivatives (L function), are implemented in the R (<http://www.r-project.org/>) supplementary package spatstat (<http://www.spatstat.org/>) developed by Baddeley and Turner (2005). A preliminary study using 10 embryos just before hatching (stage 30) demonstrated that chromatophores are not randomly distributed at small distances (Fig. 3F), and suggested the existence of repulsion between them during ontogenesis. No gene has been identified in cephalopods that could explain the strict distribution of chromatophores, but this short-distance repulsion is obviously reminding of a lateral inhibition process such as described for the

Notch/Delta system (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Fortini, 2009). Moreover, plotting the number of neighbours of similar colours (here only two classes were considered: “pale” and “dark”) of a chromatophore in function of the distance, showed that the respective position of pale and dark chromatophores was not random (Fig. 3G). Thus, two biological processes seem to be involved in the spatial distribution of chromatophores: a lateral inhibition between all chromatophores determining the repartition of “coloured points”, and a lateral exclusion between “pale” and “dark” chromatophores constraining the distribution of colours.

### 5.3. Chromatophore control by the brain

Many classical studies investigating the organization of the adult cephalopod nervous system have proposed a pathway involved in the control of body patterns which runs from the eye to the chromatophores via the brain (Boycott, 1961; Dubas et al., 1986; Young, 1971, 1974, 1976). Interestingly, the newly hatched cuttlefish are already able to produce complex body patterns and behaviours in response to environmental variations (Barbosa et al., 2007; Hanlon and Messenger, 1988). Thus, the ‘neural networks’ involved in the control of body patterning should develop during the embryonic development to become functional at hatching. Several studies performed in *S. officinalis* have demonstrated the involvement of FMRFamide-related peptides (FaRPs) in the control of the colouration patterning (Gaston and Tublitz, 2004; Loi and Tublitz, 2000; Loi et al., 1996; Tublitz et al., 2006). In a recent study, we have explored the potential involvement of these peptides during the embryonic development of the cuttlefish (Aroua et al., 2011). We have shown a precocious appearance and implementation of FaRPs neuronal networks during *S. officinalis*’ development. As a result of their distribution, FaRPs may act as neurotransmitters/neuromodulators. This distribution also suggests the existence of a FaRPs pathway going from the optic lobe to the chromatophore muscles. Thus, FaRPs could exert specific ‘embryonic’ functions (e.g., an involvement in neurogenesis) as well as they could start their ‘adult’ functions (e.g., the control of chromatophores). Further studies are necessary to clarify the functionality of this FaRPs pathway as well as the role of other neurotransmitter/neuromodulators.

Finally, the relationships of all the structures implied in camouflage and communication – skin, eye, brain – remain to be explored during development. This may become a pertinent example of an eco-evo-devo approach in the case of *Sepia*. For example, opsin was recently detected in adult *S. officinalis*’ skin, suggesting a light-sensing role for the skin surface (Mähthger et al., 2010). If this is also true for embryos, the specific dark colour of the egg envelopes of *S. officinalis* insulates the embryo from light in the laying sites – the intertidal area – and could be an important prerequisite for a proper maturation of the colouration pathways in these ecological conditions. In this context, the selection of a black capsule during evolution makes sense.

## 6. *S. officinalis*, a species in changing environment

An eco-evo-devo approach is particularly pertinent in the context of changing environment, either natural such as tides or linked to human influence in the context of global changes. *Sepia* lay eggs near the coasts, and this changing environment is a natural experimental field to understand how physiological regulatory mechanisms have been selected during evolution, and to predict sensitivity to future climate changes and their consequences such as modification of seawater pCO<sub>2</sub> and pH.

In contrast to other molluscs, including squids, exposure to highly elevated seawater pCO<sub>2</sub> does not change the metabolism of juvenile *S. officinalis* (Gutowska et al., 2008, 2010a). These results demonstrate the high ionic regulation capacities of cuttlefish (Hu et al., 2011a, 2011b, 2011c), a convergence with teleosts that may be interpreted in the classical framework of a convergence due to competition between

cephalopods and vertebrates as predators or prey (O’Dor and Webber, 1986; Packard, 1972).

The situation is more complex during development. Cuttlefish embryos already encounter stringent abiotic conditions inside the egg (e.g., pCO<sub>2</sub> = 0.4 kPa in the capsule) during late stages of embryogenesis under normocapnia (pCO<sub>2</sub> = 0.04 kPa). The protective capsule acts as a barrier to diffusion of gases, in particular of CO<sub>2</sub> produced by the growing embryo (Gutowska and Melzner, 2009). Interestingly, all ion-regulatory epithelia – including epidermal, yolk-sac, pancreatic appendages and gill ionocytes – are already functional in *Sepia* late embryos whereas ion-regulatory epithelia are far from a mature organization or activity in *Loligo* embryos at the same stages (Hu et al., 2010; Hu et al., 2011a). The highly protective capsule and the precocious physiological maturation have probably been co-selected in cuttlefish as a response to high variations of external abiotic conditions during development in the intertidal area. Unfortunately, the capsule does not protect *Sepia* embryos from elevated seawater pCO<sub>2</sub>. The modification of ion transporters expression in ion-regulatory epithelia under hypercapnia demonstrates that constraints due to environmental pCO<sub>2</sub> come in addition to the constraints due to the naturally high pCO<sub>2</sub> inside the egg (Hu et al., 2011b). As a result, if the energy budget of adult cephalopods is not significantly modified during long-term exposure to moderate environmental hypercapnia, cephalopod early life stages could be seriously challenged by elevation of seawater pCO<sub>2</sub> (Hu et al., 2011b).

Finally, global changes may have severe consequences on mineralization processes of aquatic organisms (Dupont et al., 2010; Gaylord et al., 2011). Cuttlefish are the only coleoid to have a mineralized shell and consequently to be concerned by this issue. Surprisingly, calcification rate increases and leads to a less porous cuttlebone in juvenile cuttlefish under environmental hypercapnia. The structural modifications observed are suggested to have a potential negative impact on the light-weight and buoyancy regulatory functions of the cuttlebone (Gutowska et al., 2008, 2010b). Calcification control remains to be solved in coleoids. Several genes involved in the shell development have been characterized during the metamorphosis and post-metamorphosis stages of *Haliotis asinina* (Jackson et al., 2007) and should be studied in *Sepia* embryo in the light of environmental cues.

## 7. Conclusion

Currently, *S. officinalis* is a so-called “unconventional” model, but aims for becoming a pertinent cephalopod representative. From an eco-evo-devo point of view, *S. officinalis* is a very interesting species. The life of *S. officinalis* is necto-benthic. Its development – a telolecithal egg developing inside a capsule in the intertidal zone – is under intrinsic as well as environmental constraint. After a direct development without metamorphosis, hatchling is accompanied by an important environmental change, as illustrated by the pCO<sub>2</sub> (Hu et al., 2011b). From a developmental, physiological or ecological point of view, this species is a kind of ‘integrative hot spot’ among cephalopods.

Moreover, the comparison of the (few) known gene expression patterns with similar data obtained in other molluscs and vertebrates point out striking differences (e.g., the neuromuscular system). This fact is obviously linked to the derived state of the cephalopod clade, but is informative about the diversity and the plasticity of regulation pathways at the gene level. From an evolutionary point of view, cephalopods – and among them *S. officinalis* – are fascinating species and deserve to be better studied in order to understand the evolution of the molluscan and lophotrochozan clades.

Finally, there is a clear need to bring new models to the scientific community to fully appreciate the diversity and the evolution of the mechanisms underlying biodiversity. Available molecular data are until now concentrated on vertebrate and ecdysozoan groups. Around 60% of animal species concerned by at least one achieved/on-going/funded genome sequencing projects belong to Deuterostomia (~5% of

the known Metazoa). Regarding molluscs (~10% of Metazoa), only 12 species are studied, and among them, 6 are in the gastropod genus *Lottia*. This lack of genomic data does not facilitate the identification of homologous genes in cephalopods and obviously precludes any metagenomic approaches.

The adaptive abilities of the cuttlefish, *S. officinalis*, to different but always stringent natural environments during the different phases of its life cycle (e.g., the exquisite ionic regulations pointed by Melzner's research), the numerous 'intermediate characters' expressed by this species (necto-benthic, giant fibres and chromatophores), and the remarkable molecular diversity already illustrated in this species even for cephalopod specific protein family (Bassaglia et al., 2012) indicate that the huge genome of *Sepia* is potentially rich in information that would be useful for all cephalopodists. With *S. officinalis* being additionally an ideally suitable eco-evo-devo model, we propose that its genome sequencing be a priority in the cephalopod clade.

## Acknowledgements

Work from the authors was supported by an ANR (Agence Nationale de la Recherche) grant (number: JC/JC 0043-06). Research on *S. officinalis*' development was possible, thanks to Joel Henry and Sebastien Henry who provided eggs from respectively the biological marine station of Luc/mer (University of Caen) and Roscoff (UPMC). We also thank Sandra Navet and Martin Rossi for their respective data on Shh and chromatophore dynamics, Leanne Hardman and Christian Atkinson (Erasmus programme, Univ. Keele/MNHN) for helpful corrections on the article. The *Sepia* EST bank has been obtained in collaboration with Corinne Da Silva (CEA Genoscope). [SS]

## References

- Akazawa, H., Komuro, I., 2005. Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: its role in cardiac development and diseases. *Pharmacol. Ther.* 107, 252–268.
- Andouche, A., Bassaglia, Y., Baratte, S., Bonnaud, L., 2013. Reflectin genes and development of iridophore patterns in *Sepia officinalis* embryos (Mollusca, Cephalopoda). *Dev. Dyn.* <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.23938>.
- Antoshechkin, I., Sternberg, P.W., 2007. The versatile worm: genetic and genomic resources for *Caenorhabditis elegans* research. *Nat. Rev. Genet.* 8, 518–532.
- Arnold, J.M., Young, R.E., King, M.V., 1974. Ultrastructure of a cephalopod photophore. 2: Iridophores as reflectors and transmitters. *Biol. Bull.* 147, 522–534.
- Aroua, S., Andouche, A., Martin, M., Baratte, S., Bonnaud, L., 2011. FaRP cell distribution in the developing CNS suggests the involvement of FaRPs in all parts of the chromatophore control pathway in *Sepia officinalis* (Cephalopoda). *Zoology* 114, 113–122.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., Lake, R.J., 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770–776.
- Baddeley, A., Turner, R., 2005. Spatstat: an R package for analyzing spatial point patterns. *J. Stat. Softw.* 12, 1–42.
- Baratte, S., Bonnaud, L., 2009. Evidence of early nervous differentiation and early catecholaminergic sensory system during *Sepia officinalis* embryogenesis. *J. Comp. Neurol.* 517, 539–549.
- Barbosa, A., Mähger, L.M., Chubb, C., Florio, C., Chiao, C.C., Hanlon, R.T., 2007. Disruptive coloration in cuttlefish: a visual perception mechanism that regulates ontogenetic adjustment of skin patterning. *J. Exp. Biol.* 210, 1139–1147.
- Bassaglia, Y., Bekel, T., Da Silva, C., Poulain, J., Andouche, A., Navet, S., Bonnaud, L., 2012. ESTs library from embryonic stages reveals tubulin and reflectin diversity in *Sepia officinalis* (Mollusca – Cephalopoda). *Gene* 498, 203–211.
- Bentzinger, C.F., Wang, Y.X., Rudnicki, M.A., 2012. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a008342.
- Boletzky, S.V., 1988. Cephalopod development and evolutionary concepts. In: Clarke, M.R., Trueman, E.R. (Eds.), *The Mollusca. Paleontology and Neontology of Cephalopods*, vol. 12. Academic Press, San Diego, CA, pp. 185–202.
- Boletzky, S.V., 2006. The *Sepia* egg: a showcase of cephalopod embryology. *Vie Milieu* 56, 191–201.
- Boycott, B.B., 1961. Functional organization of brain of cuttlefish *Sepia officinalis*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 153, 503–534.
- Brand, T., 2003. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev. Biol.* 258, 1–19.
- Bruneau, B.G., 2002. Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ. Res.* 90, 509–519.
- Buckingham, M., Relaix, F., 2007. The role of *Pax* genes in the development of tissues and organs: *Pax3* and *Pax7* regulate muscle progenitor cell functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 645–673.
- Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D., Relaix, F., 2003. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J. Anat.* 202, 59–68.
- Buckingham, M., Meilhac, S., Zaffran, S., 2005. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat. Rev. Genet.* 6, 826–835.
- Budelmann, B.U., Bonn, U., 1982. Histochemical evidence for catecholamines as neurotransmitters in the statocyst of *Octopus vulgaris*. *Cell Tissue Res.* 227, 475–483.
- Budelmann, B.U., Schipp, R., Boletzky, S.V., 1997. Cephalopoda. In: Harrison, F.W., Kohn, A.J. (Eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 119–414.
- Buznikov, G.A., Shmukler, Y.B., Lauder, J.M., 1996. From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development? *Cell. Mol. Neurobiol.* 16, 533–559.
- Capasso, A., Carginale, V., Madonna, L., Mancaniello, D., Scudiero, R., De Prisco, P.P., De Petrocellis, B., Parisi, E., 1991. A dopamine-sensitive and octopamine-sensitive adenylate-cyclase in the nervous-system of *Octopus vulgaris*. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 100, 805–808.
- Capasso, A., Carginale, V., Borrelli, L., Parisi, E., 1993. Receptor-mediated inhibition of octopamine-stimulated adenylate-cyclase in the optic lobe of *Octopus vulgaris*. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 106, 555–559.
- Chun, C.K., Scheetz, T.E., Fatima Bonaldo, M., Brown, B., Clemens, A., Crookes-Goodson, W.J., Crouch, K., DeMartini, T., Eyestone, M., Goodson, M.S., Janssens, B., Kimbell, J.L., Koropatnick, T.A., Kucaba, T., Smith, C., Stewart, J.J., Tong, D., Troll, J.V., Webster, S., Winhall-Rice, J., Yap, C., Casavant, T.L., McFall-Ngai, M.J., Soares, M., 2006. An annotated cDNA library of juvenile *Euprymna scolopes* with and without colonization by the symbiont *Vibrio fischeri*. *BMC Genomics* 7, 154.
- Coon, S.L., Bonar, D.B., Weiner, R.M., 1985. Induction of settlement and metamorphosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), by L-DOPA and catecholamines. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 94, 211–221.
- Croll, R.P., Jackson, D.L., Voronezhskaya, E.E., 1997. Catecholamine-containing cells in larval and postlarval bivalve molluscs. *Biol. Bull.* 193, 116–124.
- Crookes, W.J., Ding, L.L., Huang, Q.L., Kimbell, J.R., Horwitz, J., McFall-Ngai, M.J., 2004. Reflectins: the unusual proteins of squid reflective tissues. *Science* 303, 235–238.
- DeGiorgis, J.A., Cavaliere, K.R., Burbach, J.P., 2011. Identification of molecular motors in the Woods Hole squid, *Loligo pealei*: an expressed sequence tag approach. *Cytoskeleton* 68, 566–577.
- Denton, E.J., Land, M.F., 1971. Mechanism of reflexion in silvery layers of fish and cephalopods. *Proc. R. Soc. Lond. B* 178, 43–61.
- Dickel, L., Chichery, M.P., Chichery, R., 1997. Postembryonic maturation of the vertical lobe complex and early development of predatory behavior in the cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Neurobiol. Learn. Mem.* 67, 150–160.
- Dickel, L., Boal, J.G., Budelmann, B.U., 2000. The effect of early experience on learning and memory in cuttlefish. *Dev. Psychobiol.* 36, 101–110.
- Dubas, F., Leonard, R.B., Hanlon, R.T., 1986. Chromatophore motoneurons in the brain of the squid, *Lolliguncula brevis* – an HRP study. *Brain Res.* 374, 21–29.
- Dupont, S., Ortega-Martinez, O., Thorndyke, M., 2010. Impact of near-future ocean acidification on echinoderms. *Ecotoxicology* 19, 449–462.
- Elliott, D.A., Solloway, M.J., Wise, N., Biben, C., Costa, M.W., Furtado, M.B., Lange, M., Dunwoodie, S., Harvey, R.P., 2006. A tyrosine-rich domain within homeodomain transcription factor Nkx2-5 is an essential element in the early cardiac transcriptional regulatory machinery. *Development* 133, 1311–1322.
- Fiore, G., Poli, A., Di Cosmo, A., d'Ischia, M., Palumbo, A., 2004. Dopamine in the ink defence system of *Sepia officinalis*: biosynthesis, vesicular compartmentation in mature ink gland cells, nitric oxide (NO)/cGMP-induced depletion and fate in secreted ink. *Biochem. J.* 378, 785–791.
- Fortini, M.E., 2009. Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev. Cell* 16, 633–647.
- Gao, Y.M., Natsukari, Y., 1990. Karyological studies on seven cephalopods. *Venus* 49, 126–145.
- Gaston, M.R., Tublitz, N.J., 2004. Peripheral innervation patterns and central distribution of fin chromatophore motoneurons in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *J. Exp. Biol.* 207, 3089–3098.
- Gaylord, B., Hill, T.M., Sanford, E., Lenz, E.A., Jacobs, L.A., Sato, K.N., Russell, A.D., Hettinger, A., 2011. Functional impacts of ocean acidification in an ecologically critical foundation species. *J. Exp. Biol.* 214, 2586–2594.
- Grimaldi, A., Tettamanti, G., Brivio, M.F., Valvassori, R., de Eguileor, M., 2004a. Differentiation of slow and fast fibers in tentacles of *Sepia officinalis* (Mollusca). *Dev. Growth Differ.* 46, 181–193.
- Grimaldi, A., Tettamanti, G., Rinaldi, L., Brivio, M.F., Castellani, D., de Eguileor, M., 2004b. Muscle differentiation in tentacles of *Sepia officinalis* (Mollusca) is regulated by muscle regulatory factors (MRF) related proteins. *Dev. Growth Differ.* 46, 83–95.
- Guertin, M.J., Petesch, S.J., Zobeck, K.L., Min, I.M., Lis, J.T., 2010. *Drosophila* heat shock system as a general model to investigate transcriptional regulation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 75, 1–9.
- Gutowska, M.A., Melzner, F., 2009. Abiotic conditions in cephalopod (*Sepia officinalis*) eggs: embryonic development at low pH and high pCO<sub>2</sub>. *Mar. Biol.* 156, 515–519.
- Gutowska, M.A., Portner, H.O., Melzner, F., 2008. Growth and calcification in the cephalopod *Sepia officinalis* under elevated seawater pCO<sub>2</sub>. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 373, 303–309.
- Gutowska, M.A., Melzner, F., Langenbuch, M., Bock, C., Claireaux, G., Portner, H.O., 2010a. Acid-base regulatory ability of the cephalopod (*Sepia officinalis*) in response to environmental hypercapnia. *J. Comp. Physiol. B: Biochem. System. Environ. Physiol.* 180, 323–335.
- Gutowska, M.A., Melzner, F., Portner, H.O., Meier, S., 2010b. Cuttlebone calcification increases during exposure to elevated seawater pCO<sub>2</sub> in the cephalopod *Sepia officinalis*. *Mar. Biol.* 157, 1653–1663.
- Hallinan, N.M., Lindberg, D.R., 2011. Comparative analysis of chromosome counts infers three paleopolyploidies in the Mollusca. *Genome Biol. Evol.* 3, 1150–1163.
- Hanlon, R.T., Messenger, J.B., 1988. Adaptive coloration in young cuttlefish (*Sepia officinalis* L.): the morphology and development of body patterns and their relation to behaviour. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 320, 437–487.



- Hanlon, R.T., Messenger, J.B., 1996. Cephalopod Behaviour. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1–232.
- Hanlon, R.T., Cooper, K.M., Budelmann, B.U., Pappas, T.C., 1990. Physiological color-change in squid iridophores. 1. Behavior, morphology and pharmacology in *Lolliguncula brevis*. Cell Tissue Res. 259, 3–14.
- Hanlon, R.T., Chiao, C.C., Mäthger, L.M., Barbosa, A., Buresch, K.C., Chubb, C., 2009. Cephalopod dynamic camouflage: bridging the continuum between background matching and disruptive coloration. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B 364, 429–437.
- Harvey, R.P., 1996. NK-2 homeobox genes and heart development. Dev. Biol. 178, 203–216.
- Henry, J.J., Collin, R., Perry, K.J., 2010. The slipper snail, *Crepidula*: an emerging lophotrochozoan model system. Biol. Bull. 218, 211–229.
- Hinegardner, R., 1974. Cellular DNA content of the Mollusca. Comp. Biochem. Physiol. A: Physiol. 47, 447–460.
- Hu, M.Y., Sucre, E., Charmantier-Daures, M., Charmantier, G., Lucassen, M., Himmerkus, N., Melzner, F., 2010. Localization of ion-regulatory epithelia in embryos and hatchlings of two cephalopods. Cell Tissue Res. 339, 571–583.
- Hu, M.Y., Tseng, Y.C., Lin, L.Y., Chen, P.Y., Charmantier-Daures, M., Hwang, P.P., Melzner, F., 2011a. New insights into ion regulation of cephalopod molluscs: a role of epidermal ionocytes in acid-base regulation during embryogenesis. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 301, R1700–R1709.
- Hu, M.Y., Tseng, Y.C., Stumpp, M., Gutowska, M.A., Kiko, R., Lucassen, M., Melzner, F., 2011b. Elevated seawater pCO<sub>2</sub> differentially affects branchial acid-base transporters over the course of development in the cephalopod *Sepia officinalis*. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 300, R1100–R1114.
- Hu, M.Y., Tseng, Y.C., Stumpp, M., Gutowska, M.A., Kiko, R., Lucassen, M., Melzner, F., 2011c. Elevated seawater pCO<sub>2</sub> differentially affects branchial acid-base transporters over the course of development in the cephalopod *Sepia officinalis* (correction; vol 300, pg R1100, 2011). Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 301, R559–R.
- Ingham, P.W., McMahon, A.P., 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. Genes Dev. 15, 3059–3087.
- Izumi, M., Sweeney, A.M., DeMartini, D., Weaver, J.C., Powers, M.L., Tao, A., Silvas, T.V., Kramer, R.M., Crookes-Goodson, W.J., Mäthger, L.M., Naik, R.R., Hanlon, R.T., Morse, D.E., 2010. Changes in reflectin protein phosphorylation are associated with dynamic iridescence in squid. J. R. Soc. Interface 7, 549–560.
- Jackson, D.J., Worheide, G., Degnan, B.M., 2007. Dynamic expression of ancient and novel molluscan shell genes during ecological transitions. BMC Evol. Biol. 7, 160.
- Juorio, A.V., 1971. Catecholamines and 5-hydroxytryptamine in nervous tissue of cephalopods. J. Physiol. 216, 213–226.
- Kasahara, H., Bartunkova, S., Schinke, M., Tanaka, M., Izumo, S., 1998. Cardiac and extracardiac expression of Csx/Nkx2.5 homeodomain protein. Circ. Res. 82, 936–946.
- Kier, W.M., 1985. The musculature of squid arms and tentacles – ultrastructural evidence for functional differences. J. Morphol. 185, 223–239.
- Kier, W.M., 1989. The fin musculature of cuttlefish and squid (Mollusca, Cephalopoda) – morphology and mechanics. J. Zool. 217, 23–38.
- Kier, W.M., 1991. Squid cross-striated muscle – the evolution of a specialized muscle-fiber type. Bull. Mar. Sci. 49, 389–403.
- Kier, W.M., Schachat, F.H., 2008. Muscle specialization in the squid motor system. J. Exp. Biol. 211, 164–169.
- Kier, W.M., Thompson, J.T., 2003. Muscle arrangement, function and specialization in recent coleoids. Berliner Paläobiol. Abh. 03, 141–162.
- Kime, D.E., Messenger, J.B., 1990. Monoamines in the cephalopod CNS – an HPLC analysis. Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 96, 49–57.
- Kling, G., Schipp, R., 1987. Comparative ultrastructural and cytochemical analysis of the cephalopod systemic heart and its innervation. Experientia 43, 502–511.
- Kondo, H., Morita, T., Ikeda, M., Kurosaka, C., Shitara, A., Honda, Y., Nozaki, R., Aoki, T., Hirano, I., 2010. Identification of enzyme genes in the liver of the Bleeker's squid *Loligo bleekeri* by expressed sequence tag analysis. Fish. Sci. 76, 161–165.
- Krauss, S., Concordet, J.P., Ingham, P.W., 1993. A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. Cell 75, 1431–1444.
- Kröger, B., Vinther, J., Fuchs, D., 2011. Cephalopod origin and evolution: a congruent picture emerging from fossils, development and molecules. Bioessays 33, 602–613.
- Lemaire, J., 1970. Table de développement embryonnaire de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Cephalopode). Bull. Soc. Zool. France 95, 773–782.
- Lints, T.J., Parsons, L.M., Hartley, L., Lyons, I., Harvey, R.P., 1993. *Nkx-2.5* – a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. Development 119, 419–431.
- Loi, P.K., Tublitz, N.J., 2000. Roles of glutamate and FMRFamide-related peptides at the chromatophore neuromuscular junction in the cuttlefish, *Sepia officinalis*. J. Comp. Neurol. 420, 499–511.
- Loi, P.K., Saunders, R.G., Young, D.C., Tublitz, N.J., 1996. Peptidergic regulation of chromatophore function in the European cuttlefish *Sepia officinalis*. J. Exp. Biol. 199, 1177–1187.
- Lucero, M.T., Gilly, W.F., 1995. Physiology of squid olfaction. In: Abbott, N.J., Williamson, R., Maddock, L. (Eds.), Cephalopod Neurobiology: Neuroscience Studies in Squid, Octopus and Cuttlefish. Oxford University Press, Oxford; New York, pp. 521–534.
- Makman, M.H., Berrios, I., Pratt, S., Hanhm, R.T., Stefano, G.B., 1987. Anatomical localization of dopaminergic systems in *Octopus* retina; evidence for intrinsic dopamine-containing cells and dopamine D1 receptors. In: Boer, H.H., Geraerts, W.P.M., Joesse, J. (Eds.), Neurobiology: Molluscan Models. Proceedings of the Second Symposium on Molluscan Neurobiology held at the Department of Zoology of the Free University, Amsterdam, The Netherlands, August 18–22, 1986. North-Holland, Amsterdam, pp. 31–35.
- Masthay, M.B., 1997. Color changes induced by pigment granule aggregation in chromatophores: a quantitative model based on Beer's Law. Photochem. Photobiol. 66, 649–658.
- Mäthger, L.M., Denton, E.J., 2001. Reflective properties of iridophores and fluorescent 'eyespot' in the loliginid squid *Alloteuthis subulata* and *Loligo vulgaris*. J. Exp. Biol. 204, 2103–2118.
- Mäthger, L.M., Denton, E.J., Marshall, N.J., Hanlon, R.T., 2009. Mechanisms and behavioural functions of structural coloration in cephalopods. J. R. Soc. Interface 6, S149–S163.
- Mäthger, L.M., Roberts, S.B., Hanlon, R.T., 2010. Evidence for distributed light sensing in the skin of cuttlefish, *Sepia officinalis*. Biol. Lett. 6, 600–603.
- McCobb, D.P., Cohan, C.S., Connor, J.A., Kater, S.B., 1988a. Interactive effects of serotonin and acetylcholine on neurite elongation. Neuron 1, 377–385.
- McCobb, D.P., Haydon, P.G., Kater, S.B., 1988b. Dopamine and serotonin inhibition of neurite elongation of different identified neurons. J. Neurosci. Res. 19, 19–26.
- Messenger, J.B., 1974. Reflecting elements in cephalopod skin and their importance for camouflage. J. Zool. 174, 387–395.
- Messenger, J.B., 1979. The eyes and skin of *Octopus*: compensating for sensory deficiencies. Endeavour 3, 92–98.
- Messenger, J.B., 1996. Neurotransmitters of cephalopods. Inv. Neurosci. 2, 95–114.
- Messenger, J.B., 2001. Cephalopod chromatophores: neurobiology and natural history. Biol. Rev. 76, 473–528.
- Millman, B.M., 1967. Mechanism of contraction in molluscan muscle. Am. Zool. 7, 583–591.
- Müller, G.B., 2007. Evo-devo: extending the evolutionary synthesis. Nat. Rev. Genet. 8, 943–949.
- Naef, A., 1928. Die Cephalopoden Embryologie, Fauna und Flora des Golfes von Neapel. Monographie 35. Stazione Zoologica di Napoli ed. Friedländer & Sohn, Berlin, pp. 1–357 (+ 37 pls).
- Nave, S., Bassaglia, Y., Baratte, S., Martin, M., Bonnaud, L., 2008. Somatic muscle development in *Sepia officinalis* (Cephalopoda – Mollusca): a new role for NK4. Dev. Dyn. 237, 1944–1951.
- Nave, S., Andouche, A., Baratte, S., Bonnaud, L., 2009. *Shh* and *Pax6* have unconventional expression patterns in embryonic morphogenesis in *Sepia officinalis* (Cephalopoda). Gene Expr. Patterns 9, 461–467.
- Nederbragt, A.J., van Loon, A.E., Dictus, W.J.A.G., 2002. Expression of *Patella vulgata* orthologs of engrailed and dpp-BMP2/4 in adjacent domains during molluscan shell development suggests a conserved compartment boundary mechanism. Dev. Biol. 246, 341–355.
- Nguyen, L., Rigo, J.M., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Rogister, B., Leprince, P., Moonen, G., 2001. Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. Cell Tissue Res. 305, 187–202.
- O'Dor, R.K., Webber, D.M., 1986. The constraints on cephalopods: why squid aren't fish. Can. J. Zool. 64, 1591–1605.
- Ogura, A., Ikeo, K., Gojobori, T., 2004. Comparative analysis of gene expression for convergent evolution of camera eye between octopus and human. Genome Res. 14, 1555–1561.
- Olson, E.N., 2006. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. Science 313, 1922–1927.
- Packard, A., 1972. Cephalopods and fish: the limits of convergence. Biol. Rev. 47, 241–307.
- Packard, A., 1985. Sizes and distribution of chromatophores during post-embryonic development in cephalopods. Vie Milieu 35, 285–298.
- Packard, A., Hochberg, F.G., 1977. Skin patterning in *Octopus* and other genera. Symp. Zool. Soc. Lond. 38, 191–231.
- Packard, A., Sanders, G., 1969. What octopus shows to world. Endeavour 28, 92–99.
- Page, D.T., 2002. Inductive patterning of the embryonic brain in *Drosophila*. Development 129, 2121–2128.
- Parra, L.M., Zou, Y.M., 2010. Sonic hedgehog induces response of commissural axons to semaphorin repulsion during midline crossing. Nat. Neurosci. 13, 29–35.
- Pechenik, J.A., Li, W., Cochrane, D.E., 2002. Timing is everything: the effects of putative dopamine antagonists on metamorphosis vary with larval age and experimental duration in the prosobranch gastropod *Crepidula fornicata*. Biol. Bull. 202, 137–147.
- Pierce, G.J., Allcock, L., Bruno, I., Bustamante, P., González, Á., Guerra, A., Jereb, P., Lefkaiditou, E., Malham, S.K., Moreno, A., Pereira, J., Piatkowski, U., Rasero, M., Sánchez, P., Santos, M.B., Santurtún, M., Seixas, S., Sobrino, I., Villanueva, R., 2010. Cephalopod biology and fisheries in Europe. ICES Cooperative Research Report, No. 303, pp. 1–175.
- Pires, A., Coon, S.L., Hadfield, M.G., 1997. Catecholamines and dihydroxyphenylalanine in metamorphosing larvae of the nudibranch *Phestilla sibogae* Bergh (Gastropoda: Opisthobranchia). J. Comp. Physiol. A: Neuroethol. Sens. Neur. Behav. Physiol. 181, 187–194.
- Pires, A., Croll, R.P., Hadfield, M.G., 2000. Catecholamines modulate metamorphosis in the opisthobranch gastropod *Phestilla sibogae*. Biol. Bull. 198, 319–331.
- Polak, K.A., Edelman, A.M., Wasley, J.W.F., Cohan, C.S., 1991. A novel calmodulin antagonist, Cgs 9343B, modulates calcium-dependent changes in neurite outgrowth and growth cone movements. J. Neurosci. 11, 534–542.
- Price, C.J., Goldberg, J.L., 1993. Serotonin activation of a cyclic-amp-dependent sodium current in an identified neuron from *Helisoma trivolvis*. J. Neurosci. 13, 4979–4987.
- Read, R.D., 2011. *Drosophila melanogaster* as a model system for human brain cancers. Glia 59, 1364–1376.
- Ripley, B.D., 1977. Modeling spatial patterns. J. R. Stat. Soc. Ser. B: Methodol. 39, 172–212.
- Ruediger, T., Bolz, J., 104–115, 2007. Neurotransmitters and the development of neuronal circuits. Axon Growth and Guidance, 621, pp. 104–115.
- Sambasivan, R., Kuratani, S., Tajbakhsh, S., 2011. An eye on the head: the development and evolution of craniofacial muscles. Development 138, 2401–2415.
- Schipp, R., Schafer, A., 1969. Comparative electron-microscopic studies on central cardiac organs of cephalopods (*Sepia officinalis*). Ultrastructure of heart. Z. Zellforsch. Microsc. Anat. 98, 576–598.
- Silver, S.C., Patterson, J.A., Mobbs, P.G., 1983. Biogenic-amines in cephalopod retina. Brain Res. 273, 366–368.

- Song, L.J., Liu, Y.H., Yu, Y., Duan, X., Qi, S.N., Liu, Y.B., 2012. Shh signaling guides spatial pathfinding of raphespinal tract axons by multidirectional repulsion. *Cell Res.* 22, 697–716.
- Souza, B.R., Tropepe, V., 2011. The role of dopaminergic signalling during larval zebrafish brain development: a tool for investigating the developmental basis of neuropsychiatric disorders. *Rev. Neurosci.* 22, 107–119.
- Spencer, G.E., Klumperman, J., Syed, N.I., 1998. Neurotransmitters and neurodevelopment – role of dopamine in neurite outgrowth, target selection and specific synapse formation. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 5, 451–467.
- Suzuki, H., Tasaki, K., 1983. Inhibitory retinal efferents from dopaminergic cells in the optic lobe of the octopus. *Vis. Res.* 23, 451–457.
- Tao, A.R., DeMartini, D.G., Izumi, M., Sweeney, A.M., Holt, A.L., Morse, D.E., 2010. The role of protein assembly in dynamically tunable bio-optical tissues. *Biomaterials* 31, 793–801.
- Tapscott, S.J., 2005. The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *Development* 132, 2685–2695.
- Tauber, A.I., 2012. Reframing developmental biology and building evolutionary theory's new synthesis. *Perspect. Biol. Med.* 53, 257–270.
- Tobia, C., De Sena, G., Presta, M., 2011. Zebrafish embryo, a tool to study tumor angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 505–509.
- Tublitz, N.J., Gaston, M.R., Loi, P.K., 2006. Neural regulation of a complex behavior: body patterning in cephalopod molluscs. *Integr. Comp. Biol.* 46, 880–889.
- van Valen, L., 1973. *Festschrift. Science* 180, 488.
- Vitturi, R., Colombera, D., Catalano, E., Arnold, J.M., 1990. Spermatocyte chromosome study of eight species of the class Cephalopoda (Mollusca). *J. Ceph. Biol.* 1, 101–112.
- Williamson, R., 1989. Electrophysiological evidence for cholinergic and catecholaminergic efferent transmitters in the statocyst of octopus. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 93, 23–27.
- Yacob, J., Lewis, A.C., Gosling, A., St Hilaire, D.H.J., Tesar, L., Mcrae, M., Tublitz, N.J., 2011. Principles underlying chromatophore addition during maturation in the European cuttlefish, *Sepia officinalis*. *J. Exp. Biol.* 214, 3423–3432.
- Yoshida, M., Ogura, A., 2011. Genetic mechanisms involved in the evolution of the cephalopod camera eye revealed by transcriptomic and developmental studies. *BMC Evol. Biol.* 11, 180.
- Yoshida, M., Ishikura, Y., Moritaki, T., Shoguchi, E., Shimizu, K.K., Sese, J., Ogura, A., 2011. Genome structure analysis of molluscs revealed whole genome duplication and lineage specific repeat variation. *Gene* 483, 63–71.
- Young, J.Z., 1971. The anatomy of the nervous system of *Octopus vulgaris*. Oxford University Press, London, pp. 1–690.
- Young, J.Z., 1974. The central nervous system of *Loligo* I. The optic lobe. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 267, 263–302.
- Young, J.Z., 1976. The nervous system of *Loligo* II. Suboesophageal centres. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 274, 101–167.

# **ANNEXES**

## Annexe A1

### **Protocole hybridation *in situ* simple avec révélation au NBT- BCIP *in toto***

#### **Jour 1 : Hybridation**

- à température ambiante

- rinçage des embryons 5x5min en PTW (PBS1X, tween 20 0,1%)(rinçage glycérol)
- déprotéinisation avec 1X (10mg/ml) de protéinase K pendant 20min à 37C°
- rinçage 5min en PTW
- fixation 1 heure en PAF 3,7%
- 5min en 50% PTW/ 50% SH
- 5min en SH (formamide désionisé 50%, SSC5X, Tween 20 0,1%, SDS 1%)

-à 65C°

- en tampon de pré-adsorption (SH, héparine 25mg/ml, tRNA 100mg/ml) pendant 6h
- en tampon d'hybridation (SH, héparine 33mg/ml, tRNA 400mg/ml) avec 300ng/ml de chaque sonde

#### **Jour 2 : Incubation anticorps anti-DIG**

-à 65C°, Tampons préchauffés

- rinçage 2x30s en SH puis 2x10min en SH
- 10min en 75% SH/25% SSC2X
- 10min en 50% SH/50%SSC2X
- 10min en 25% SH/75% SSC2X
- 10min en SSC2X

-à température ambiante

- 10min en 75% SSC2X/25% MABT
- 10min en 50% SSC2X/50%MABT
- 10min en 25% SSC2X/75% MABT
- 10min en MABT (acide maléique 100mM et NaCl 150mM, pH 7,5, 1% Tween 20)
- 1heure en BB 4%

-à 4C°

- anticorps anti-DIG-AP 1/100<sup>ème</sup> pour la nuit

### **Jour 3 : rinçage des anticorps anti-DIG**

-à 4C°

- 2x30s puis 6x10min en MABT
- changement de bain vers 16h pour la nuit

### **Jour 4 : révélation**

-à température ambiante

- 2x5min en AP (Tris-HCl 100mM pH 9,5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween 20) + levamisol (100mM)
  - révélation en AP, levamisol (100mM), BCIP (50mg/ml), NBT (100mg/ml), bien mélanger entre chaque ajout
  - quand signal suffisant, arrêt de la coloration
- à température ambiante :
- 2x5min en PTW
  - en PAF 3,7% pour la nuit à température ambiante

### **Jour 5 : rinçage et observation**

-à température ambiante

- 3x10min en PBS1X
- Observation et prises de vues

## Annexe A2

### Protocole hybridation *in situ* simple avec révélation fluorescente

#### Jour 1 : Hybridation

- à température ambiante
  - rinçage des embryons 5x5min en PTW (PBS1X, tween 20 0,1%)(rinçage glycérol)
  - déprotéinisation avec 1X (10\_g/ml) de protéinase K pendant 10min à température ambiante
  - rinçage 5min en PTW
  - 5min en 50% PTW/ 50% SH
  - 5min en SH (formamide désionisé 50%, SSC5X, Tween 20 0,1%, SDS 1%)
  
- à 65C°
  - en tampon de pré-adsorption (SH, héparine 25\_g/ml, tRNA 100\_g/ml) pendant 6h
  - tampon d'hybridation (SH, héparine 33\_g/ml, tRNA 400\_g/ml) avec 300ng/ml de sonde

#### Jour 2 : Incubation anticorps

- à 65C°, tampons préchauffés
  - rinçage 2x30s en SH puis 2x10min en SH
  - 10min en 75% SH/25% SSC2X
  - 10min en 50% SH/50%SSC2X
  - 10min en 25% SH/75% SSC2X
  - 10min en SSC2X
  - 30min en SSC0,2X
  
- à température ambiante
  - 5min en PTW
  - suppression des peroxydases endogènes avec de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% pendant 30min
  - 2x5min en PTW
  - 10min en 50% PTW/50%MABT
  - 10min en MABT (acide maléique 100mM et NaCl 150mM, pH 7,5, 1% Tween 20)
  - 1heure en BB 4%, FBS15% et MABT
  
- à 4C°
  - incubation avec anticorps appropriés 1/150<sup>ème</sup> pour la nuit

### **Jour 3 : rinçage des anticorps et révélation**

**Ne pas utiliser de tampon tris avec la tyramide**

- à 4C°, rinçage des anticorps
  - 2x30s puis 3x10min en PTW

**NOTE : A partir de cette étape toujours rester dans l'obscurité (jusqu'à la fin de la manip)**

- à température ambiante, révélation
  - ajout de la tyramide-fluo au 1/200<sup>ème</sup> (diluer en PTW) en présence de 0,001% final de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pendant 45min
  - rinçage 3x10min en PTW
  - inactivation de la POD avec de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% pendant 30min
  - rinçage 3x30min en PTW
  - Observation et prises de vues

### **Préparation de la Tyramide couplée au Cy3 ou à la fluoresceine (FITC)**

**ATTENTION Toujours travailler à l'abri de la lumière**

#### Préparation des tampons

- *Solution de Cy3 NHS ester ou fluoresceine NHS ester* à 10mg/ml en DMF (N,N diméthylformamide anhydrous) → 1mg Cy3 NHS ester ou FITC NHS ester + 100µl DMF

Le DMF est placé directement dans le tube contenant le Cy3 ou FITC. Le prélèvement du DMF se fait à l'aide d'une seringue car le flacon sigma est pourvu d'une membrane pour éviter l'hydratation du produit.

- *Solution de DMF-TEA* → 1ml DMF + 10µl TEA (triéthylamine)
- *Solution de tyramide* → 10mg tyramide + 1ml DMF-TEA

#### Réaction

- 100µl de Cy3-DMF + 1ml DMF-TEA-tyramide

Bien mélangé et laissé en contact pendant 2 heures à température ambiante dans le noir. Ensuite ajout de 1,2ml EtOH 100.

- 3ml de fluoresceine-DMF + 1ml DMF-TEA-tyramide

Bien mélangé et laissé en contact pendant 2 heures à température ambiante dans le noir. Ensuite ajout de 3,4ml EtOH 100.

Solutions aliquotées et conservé à -20C°.

## **Annexe A3**

### **Protocole d'hybridation *in situ* double avec révélation fluorescente sur coupes**

#### **Jour 1 : Hybridation**

- à température ambiante
  - retour à température ambiante pendant 30min
  - 2x15min en PBS1X, DEPC 0,1%
  - 15min en SSC5X
  
- à 65C°
  - en tampon de pré-hybridation pendant 2h, formamide 50%, SSC 5X, l'ADN de sperme de saumon 40µg/ml, 5X Denhardt reagent, 10% de sulfate dextran
  - tampon d'hybridation (formamide 50%, SSC 5X, l'ADN de sperme de saumon 40µg/ml, 5X Denhardt reagent, 10% de sulfate dextran) avec 300ng/ml de sonde

#### **Jour 2 : Incubation anticorps**

- à 65C°, tampons préchauffés
  - rinçage 30min en SSC2X puis 1heure en SSC2X
  - 1heure en SSC 0,1X
  
- à température ambiante
  - 5min en PTW
  - suppression des peroxydases endogènes avec de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% pendant 30min
  - 2x5min en PTW
  - 5min en MABT
  - 1heure en BB 4%, FBS15% et MABT
  
- à 4C°
  - incubation avec anticorps appropriés 1/500<sup>ème</sup> pour la nuit

#### **Jour 3 : rinçage des anticorps et révélation**

**Ne pas utiliser de tampon tris avec la tyramide**

- à 4C°, rinçage des anticorps
  - 3x10min en PTW



**NOTE : A partir de cette étape toujours rester dans l'obscurité (jusqu'à la fin de la manip)**

- à température ambiante, 1<sup>ère</sup> réaction tyramide
  - ajout de la tyramide-fluo au 1/200<sup>ème</sup> (diluer en PTW) en présence de 0,001% final de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pendant 45min
  - rinçage 3x5min en PTW
  - inactivation de la POD avec de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% pendant 30min
  - rinçage 5min en PTW
  - 5min en MABT (acide maléique 100mM et NaCl 150mM, pH 7,5, 1% Tween 20)
  - 1heure en BB 4%, FBS15% et MABT
  
- à 4C°, incubation avec le second anticorps
  - incubation avec anticorps appropriés 1/500<sup>ème</sup> pour la nuit

#### **Jour 4 : rinçage des anticorps et révélation**

- à 4C°, rinçage des anticorps
  - 3x10min en PTW
  
- à température ambiante, 2<sup>nd</sup> réaction tyramide
  - ajout de la tyramide-fluo au 1/200<sup>ème</sup> (diluer en PTW) en présence de 0,001% final de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pendant 45min
  - rinçage 3x5min en PTW
  - inactivation de la POD avec de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% pendant 30min
  - rinçage 3x10min en PTW
  - montage des lames
  - séchage des lames
  - Observation et prises de vues

## **Annexe A4**

### **Protocole d'inclusion pour coupe semi-fine**

#### **Jour 1 :**

##### **- dissection de l'embryon**

- L'embryon est placé sur la glace pour l'anesthésier
- dissection des pièces de tissus d'intérêt

##### **- fixation des tissus**

- les fragments sont placés en des tubes de 2ml renfermant 500µl de tampon de fixation (eau de mer + glutaraldéhyde 2 % + acide picrique 0,1%) pendant 1h à température ambiante
- Puis changement de bain, 500µl de tampon Sorensen 0,1M pH7,4 + 125µl de tétroxyde d'Osmium à 4% pendant une heure à température ambiante.
- Rinçage de l'Osmium 3x10min en 500µl de tampon Sorensen 0,1M pH7,4

##### **- déshydratation des tissus**

- 2x10min 2H<sub>2</sub>O/éthanol 50%
- 2x10min 2H<sub>2</sub>O/éthanol 70%
- 2x10min 2H<sub>2</sub>O/éthanol 90%
- 3x10min éthanol 100%

##### **- Bain de substitution**

Avec de la résine/alcool 50% pendant 1 heure à température ambiante

##### **- Bain d'imprégnation**

En 100% résine pendant 1 heure à température ambiante (bien supprimer le bain précédent)

##### **- Bain d'inclusion**

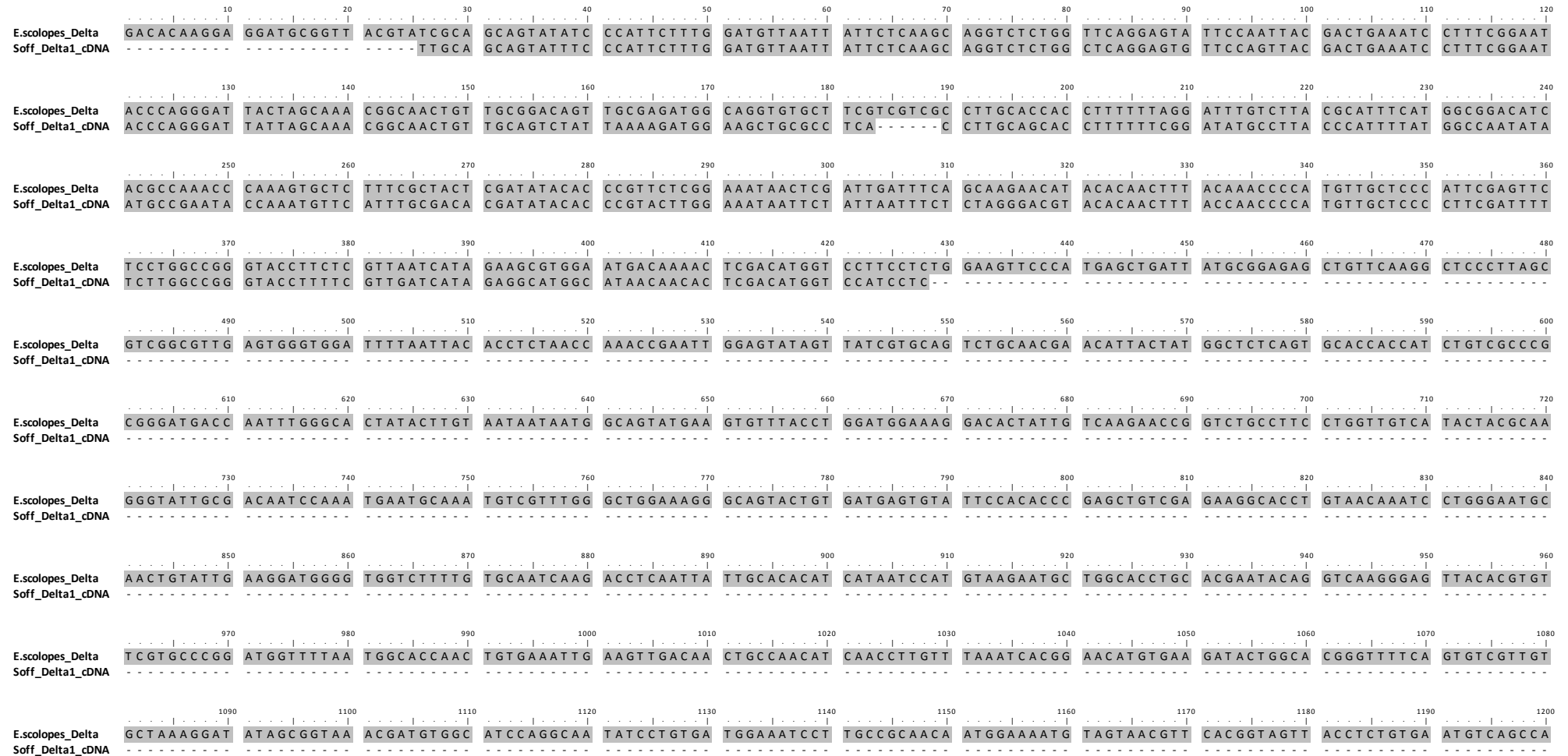
Changement de résine dans chaque tube. Laisser la nuit à température ambiante

#### **Jour 2 :**

##### **- formation des blocs**

- Mise en place des pièces dans le porte-bloc avec de la résine neuve puis placé à 37C° une demi journée (permet le dégazage de la résine, évite aux bulles d'air d'être emprisonnées dans la résine)
- Le porte-bloc est placé à 60C° jusqu'à ce que la résine soit polymérisée (peut prendre plusieurs jours)
- Démoulage des blocs et annotation.

**Annexe A5 : Aligement de la séquence d'ARNm de Delta amplifiée chez *Sepia officinalis* avec la séquence d'*Euprymna scolopes* (N° accession DQ351542)**



E.scolopes\_Delta  
Soff\_Delta1\_cDNA

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320  
GGATTTTCTG GAGCTAACTG TGAAC TTGAA ATTAATGAAT GCTTATCAAG TCCATGTA AAATGATGGTC GCTGTGTTGA TGAAGTAAAT GGATTTTCGCT GTGTTTGAC GCCTGGATT

E.scolopes\_Delta  
Soff\_Delta1\_cDNA

1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440  
AACGGGCAA CTTGCGAGGA GAATGTTAA TATTGTTCTA AAAATCCATG TCTCAATGGA GGAACGTGTA CAGATAAAGT GAACGACTTT GTGTGTCGCT GTGTGCCGGG ATACGTTGGC

E.scolopes\_Delta  
Soff\_Delta1\_cDNA

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560  
ACTTTATGCG AAGTGGCAGT GAACGACTGC GAGATCCGTC CCTGCGCTAA TGGCGGAACA TGCCAAGATC GGATCAACGA CTTTGCTTGC ATCTGTGCGC TTGGATTAC GGGAAAGGAT

E.scolopes\_Delta  
Soff\_Delta1\_cDNA

1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680  
TGTACCACTA ACATCGACGA CTGCGCACCC GACCCTTGCA AGTACGGCAA ATGCAAGGAT CTTGTTGCTG GATATCTCTG TGCTGTGTAC CCGGCTACA CGGGTCATAA TTGTGATCGT

E.scolopes\_Delta  
Soff\_Delta1\_cDNA

1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800  
AAGAAGGTT TTACAAC TCGACAAAAT AAGACAACA CGACAACAAG CCCAATGGCA GTCCCAAACC ATAGTAACGG TTTAAAGAAA GAGAAGAAAT CTCTTTCAGT CGTTCATTTG

E.scolopes\_Delta  
Soff\_Delta1\_cDNA

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920  
GGTCTAATTA TTTGTCTGG CGCTGGCATA CCACTCATAC TGATTATTAT CGCAGTAATT GTGATCTTAT TTCGACATCG GCAACATTAC TTCCGAGAAA ATATGCAGAA AGAAGGAGAA

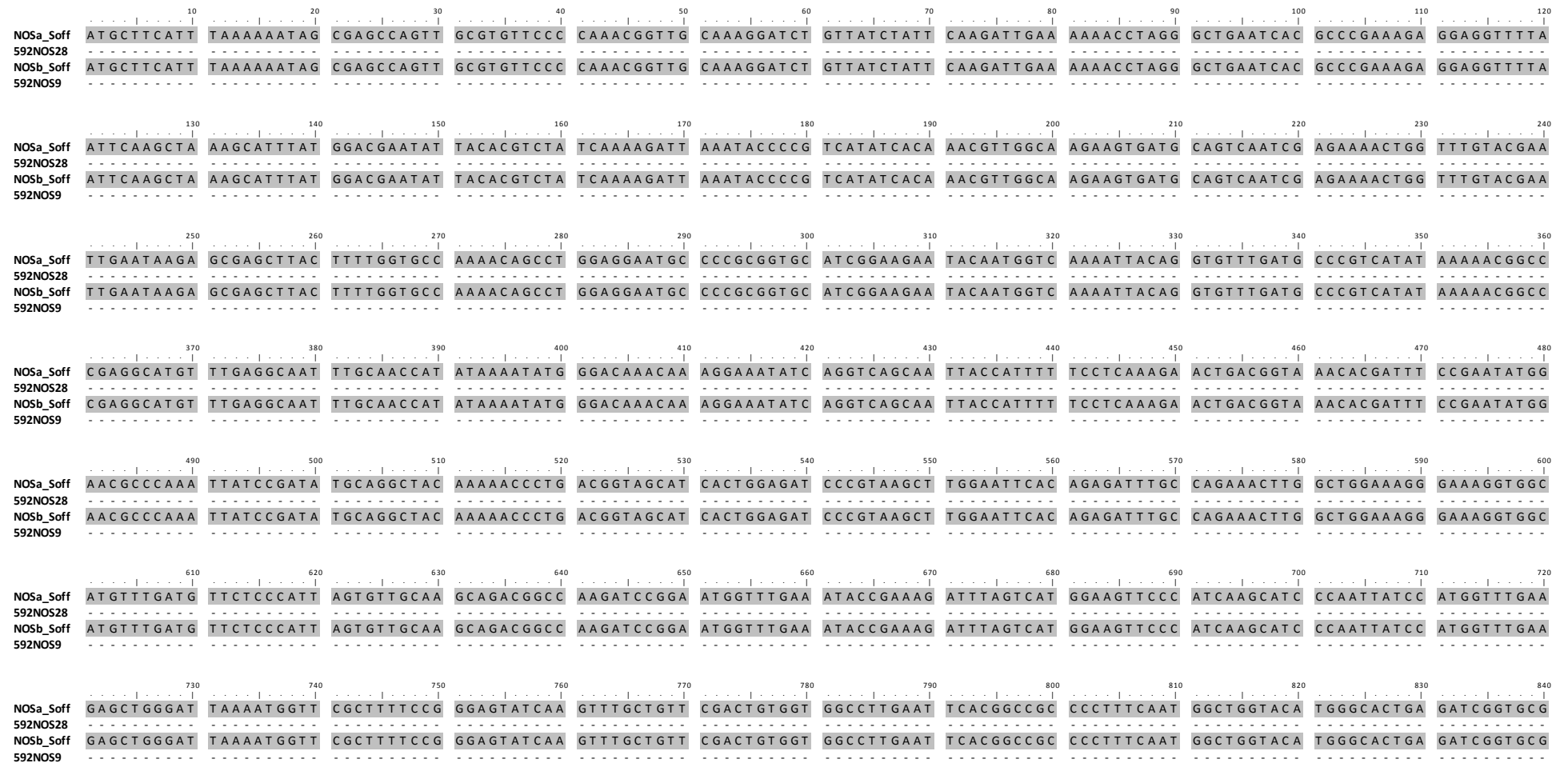
E.scolopes\_Delta  
Soff\_Delta1\_cDNA

1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040  
CAAAATAAAA TCAACAGCAA ATGTATCGAG ACGGATATTT TTACAACCAT TCCATCTGCC AGCGCTTCAG ACAAATAAC CAAAGATGAA CTTGAATGTT CAAACAGGTT CAATCCAGGC

E.scolopes\_Delta  
Soff\_Delta1\_cDNA

2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140  
CAGATTTATG ACAAATCTGC AAAAACTTA AAAACACATA AAAACAAAAT TAAAAAAAAA ATAATAAAAT TGCAATAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA

**Annexe A6 : Alignement des séquences clonées avec les séquences d'ARNm de NOSa (N° accession AY582749) et NOSb (N° accession AY582750) de *Sepia officinalis***





	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920
NOSa_Soff	ATTTCAACCA	TGGTCGAAGG	GGACGAACTA	TGTGCTCAAG	AAGAATCATT	CAAGGAATGG	GCGAATGCCG	TCTTCAAGGC	GGCGTGTGAT	ACATTCTGCT	TGCAAGATGA	CGTCAATATC
592NOS28	ATTTCAACCA	TGGTCGAAGG	GGACGAACTA	TGTGCTCAAG	AAGAATCATT	CAAGGAATGG	GCGAATGCCG	TCTTCAAGGC	GGCGTGTGAT	ACATTCTGCT	TGCAAGATGA	CGTCAATATC
NOSb_Soff	ATTTCAACCA	TGGTCGAAGG	GGACGAACTA	TGTGCTCAAG	AAGAATCATT	CAAGGAATGG	GCGAATGCCG	TCTTCAAGGC	GGCGTGTGAT	ACATTCTGCT	TGCAAGATGA	CGTCAATATC
592NOS9	ATTTCAACCA	TGGTCGAAGG	GGACGAACTA	TGTGCTCAAG	AAGAATCATT	CAAGGAATGG	GCGAATGCCG	TCTTCAAGGC	GGCGTGTGAT	ACATTCTGCT	TGCAAGATGA	CGTCAATATC
	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030	2040
NOSa_Soff	CAAGAAGCAA	CAGGAGCCCT	ACACGGCAAC	GATCAGTCTT	GGTCACTGGG	AAAATTCCGA	TTAACACCCG	AAGATGGCGT	CAAAGAAATG	GAGATTTCCA	CTGCTCTCTC	TGGTTTGCAC
592NOS28	CAAGAAGCAA	CAGGAGCCCT	ACACGGCAAC	GATCAGTCTT	GGTCACTGGG	AAAATTCCGA	TTAACACCCG	AAGATGGCGT	CAAAGAAATG	GAGATTTCCA	CTGCTCTCTC	TGGTTTGCAC
NOSb_Soff	CAAGAAGCAA	CAGGAGCCCT	ACACGGCAAC	GATCAGTCTT	GGTCACTGGG	AAAATTCCGA	TTAACACCCG	AAGATGGCGT	CAAAGAAATG	GAGATTTCCA	CTGCTCTCTC	TGGTTTGCAC
592NOS9	CAAGAAGCAA	CAGGAGCCCT	ACACGGCAAC	GATCAGTCTT	GGTCACTGGG	AAAATTCCGA	TTAACACCCG	AAGATGGCGT	CAAAGAAATG	GAGATTTCCA	CTGCTCTCTC	TGGTTTGCAC
	2050	2060	2070	2080	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160
NOSa_Soff	GGCAAGAATA	TAATGAACGC	AACTGTCATA	GAAAGACACA	ATCTCCAATC	ACCCATATCG	GAACGACAGA	CAATTCTTCT	CAAGTTAGAC	ACAAGGGGAT	CCTCAAGTTT	TACTTACGCT
592NOS28	GGCAAGAATA	TAATGAACGC	AACTGTCATA	GAAAGACACA	ATCTCCAATC	ACCCATATCG	GAACGACAGA	CAATTCTTCT	CAAGTTAGAC	ACAAGGGGAT	CCTCAAGTTT	TACTTACGCT
NOSb_Soff	GGCAAGAATA	TAATGAACGC	AACTGTCATA	GAAAGACACA	ATCTCCAATC	ACCCATATCG	GAACGACAGA	CAATTCTTCT	CAAGTTAGAC	ACAAGGGGAT	CCTCAAGTTT	TACTTACGCT
592NOS9	GGCAAGAATA	TAATGAACGC	AACTGTCATA	GAAAGACACA	ATCTCCAATC	ACCCATATCG	GAACGACAGA	CAATTCTTCT	CAAGTTAGAC	ACAAGGGGAT	CCTCAAGTTT	TACTTACGCT
	2170	2180	2190	2200	2210	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280
NOSa_Soff	CCCGGAGACC	ACGTCGGAAT	TTATCCGGCC	AACCGACCCG	ATCAAGTTGA	AACTGTTTTA	TCACGGTTGC	ACAATGCGCC	ACCTGCCGAC	CAGGTTGTTA	AGCTTGAAGT	TCTTCAAGAA
592NOS28	CCCGGAGACC	ACGTCGGAAT	TTATCCGGCC	AACCGACCCG	ATCAAGTTGA	AACTGTTTTA	TCACGGTTGC	ACAATGCGCC	ACCTGCCGAC	CAGGTTGTTA	AGCTTGAAGT	TCTTCAAGAA
NOSb_Soff	CCCGGAGACC	ACGTCGGAAT	TTATCCGGCC	AACCGACCCG	ATCAAGTTGA	AACTGTTTTA	TCACGGTTGC	ACAATGCGCC	ACCTGCCGAC	CAGGTTGTTA	AGCTTGAAGT	TCTTCAAGAA
592NOS9	CCCGGAGACC	ACGTCGGAAT	TTATCCGGCC	AACCGACCCG	ATCAAGTTGA	AACTGTTTTA	TCACGGTTGC	ACAATGCGCC	ACCTGCCGAC	CAGGTTGTTA	AGCTTGAAGT	TCTTCAAGAA
	2290	2300	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400
NOSa_Soff	CGATCACCAC	CACTTGGCCC	TGCAAAGTCC	TGGACTGGTT	TTGAACGTTT	CCCAATTTGT	ACATTGCGAA	CGGCCTTAC	CCGTTACCTG	GACATTTCTA	TCACTCCAAG	TAAGAATCTG
592NOS28	CGATCACCAC	CACTTGGCCC	TGCAAAGTCC	TGGACTGGTT	TTGAACGTTT	CCCAATTTGT	ACATTGCGAA	CGGCCTTAC	CCGTTACCTG	GACATTTCTA	TCACTCCAAG	TAAGAATCTG
NOSb_Soff	CGATCACCAC	CACTTGGCCC	TGCAAAGTCC	TGGACTGGTT	TTGAACGTTT	CCCAATTTGT	ACATTGCGAA	CGGCCTTAC	CCGTTACCTG	GACATTTCTA	TCACTCCAAG	TAAGAATCTG
592NOS9	CGATCACCAC	CACTTGGCCC	TGCAAAGTCC	TGGACTGGTT	TTGAACGTTT	CCCAATTTGT	ACATTGCGAA	CGGCCTTAC	CCGTTACCTG	GACATTTCTA	TCACTCCAAG	TAAGAATCTG
	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490	2500	2510	2520
NOSa_Soff	CTACAGTTAT	TCGCCGTCTT	AGCCACGAGC	GACTCGGACG	GAGAACGACT	GGACACTCTA	GCAAAGGACT	CACAAGCTTA	TGAAAACCTAC	AAACAGTACC	ATAGCCCGAA	TTTAGCAGAA
592NOS28	CTACAGTTAT	TCGCCGTCTT	AGCCACGAGC	GACTCGGACG	GAGAACGACT	GGACACTCTA	GCAAAGGACT	CACAAGCTTA	TGAAAACCTAC	AAACAGTACC	ATAGCCCGAA	TTTAGCAGAA
NOSb_Soff	CTACAGTTAT	TCGCCGTCTT	AGCCACGAGC	GACTCGGACG	GAGAACGACT	GGACACTCTA	GCAAAGGACT	CACAAGCTTA	TGAAAACCTAC	AAACAGTACC	ATAGCCCGAA	TTTAGCAGAA
592NOS9	CTACAGTTAT	TCGCCGTCTT	AGCCACGAGC	GACTCGGACG	GAGAACGACT	GGACACTCTA	GCAAAGGACT	CACAAGCTTA	TGAAAACCTAC	AAACAGTACC	ATAGCCCGAA	TTTAGCAGAA
	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600	2610	2620	2630	2640
NOSa_Soff	ATGTTGAAAG	ATTTCCCGTC	TTTGAAGATC	CCGCCAACGT	TATTGCTGAC	ACAACTTCCG	CTTTTGCAAC	AACGCTTCTA	TAGCGTCAGT	TCTTCACCGA	AATTCCACCC	AGGAGAGGTT
592NOS28	ATGTTGAAAG	ATTTCCCGTC	TTTGAAGATC	CCGCCAACGT	TATTGCTGAC	ACAACTTCCG	CTTTTGCAAC	AACGCTTCTA	TAGCGTCAGT	TCTTCACCGA	AATTCCACCC	AGGAGAGGTT
NOSb_Soff	ATGTTGAAAG	ATTTCCCGTC	TTTGAAGATC	CCGCCAACGT	TATTGCTGAC	ACAACTTCCG	CTTTTGCAAC	AACGCTTCTA	TAGCGTCAGT	TCTTCACCGA	AATTCCACCC	AGGAGAGGTT
592NOS9	ATGTTGAAAG	ATTTCCCGTC	TTTGAAGATC	CCGCCAACGT	TATTGCTGAC	ACAACTTCCG	CTTTTGCAAC	AACGCTTCTA	TAGCGTCAGT	TCTTCACCGA	AATTCCACCC	AGGAGAGGTT
	2650	2660	2670	2680	2690	2700	2710	2720	2730	2740	2750	2760
NOSa_Soff	CACCTGACAA	TTGCCATTGC	AAAATATATT	AAACCAAATG	GAGTCATTCA	TCACGGTATT	TGTTCAACGT	GGTTACAAAC	ATGCCCTGTA	GGTGAACAGG	TGCCGTGTGT	CATACGAGCG
592NOS28	CACCTGACAA	TTGCCATTGC	AAAATATATT	AAACCAAATG	GAGTCATTCA	TCACGGTATT	TGTTCAACGT	GGTTACAAAC	ATGCCCTGTA	GGTGAACAGG	TGCCGTGTGT	CATACGAGCG
NOSb_Soff	CACCTGACAA	TTGCCATTGC	AAAATATATT	AAACCAAATG	GAGTCATTCA	TCACGGTATT	TGTTCAACGT	GGTTACAAAC	ATGCCCTGTA	GGTGAACAGG	TGCCGTGTGT	CATACGAGCG
592NOS9	CACCTGACAA	TTGCCATTGC	AAAATATATT	AAACCAAATG	GAGTCATTCA	TCACGGTATT	TGTTCAACGT	GGTTACAAAC	ATGCCCTGTA	GGTGAACAGG	TGCCGTGTGT	CATACGAGCG

	2770	2780	2790	2800	2810	2820	2830	2840	2850	2860	2870	2880
NOSa_Soff	G C A C C T A A T T	T C C A C A T G C C	T G A A G A C G G T	A C A C G G C C A A	T C A T A A T G G T	T G G A C C G G G A	A G T G G T A T T G	C A C C A T T C C G	G A G T T T T T G G	C A A C A A A G A A	A G A T T G A C A A	A G A A A T G T T G
592NOS28	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.. C C T T T C C G	G A G T T T T T G G	C A A C A A A G A A	A G A T T G A C A A	A G A A A T G T T G
NOSb_Soff	G C A C C T A A T T	T C C A C A T G C C	T G A A G A C G G T	A C A C G G C C A A	T C A T A A T G G T	T G G A C C G G G A	A G T G G T A T T G	C A C C A T T C C G	G A G T T T T T G G	C A A C A A A G A A	A G A T T G A C A A	A G A A A T G T T G
592NOS9	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.. C C C T T C C G	G A G T T T T T G G	C A A C A A A G A A	A G A T T G A C A A	A G A A A T G T T G

	2890	2900	2910	2920	2930	2940	2950	2960	2970	2980	2990	3000
NOSa_Soff	G C T G T A C C A A	G A C A T	.....	..... G G A G A A A	A G A A A G G C T G	G G G C A G C A T G	A C A A T T T A T T	T T G G A T G C C G	C G A T C G G A A C	A T T G A C A A C A	T C T A C G A A A A	T G A A C T C A A A
592NOS28	G C T G T A C C A A	G A C A T	.....	..... G G A G A A A	A G A A A G G C T G	G G G C A G C A T G	A C A A T T T A T T	T T G G A T G C C G	C G A T C G G A A C	A T T G A C A A C A	T C T A C G A A A A	T G A A C T C A A A
NOSb_Soff	G C T G T A C C A A	G A C G T A A G T T	C C A T G A T C C T	T A T G G A G A A A	A G A A A G G C T G	G G G C A G C A T G	A C A A T T T A T T	T T G G A T G C C G	C G A T C G G A A C	A T T G A C A A C A	T C T A C G A A A A	T G A A C T C A A A
592NOS9	G C T G T A C C A A	G A C G T A A G T T	C C A T G A T C C T	T A T G G A G A A A	A G A A A G G C T G	G G G C A G C A T G	A C A A T T T A T T	T T G G A T G C C G	C G A T C G G A A C	A T T G A C A A C A	T C T A C G A A A A	T G A A C T C A A A

	3010	3020	3030	3040	3050	3060	3070	3080	3090	3100	3110	3120
NOSa_Soff	C A G T A T C A A G	A A G A A G A C G T	G C T T C A A G A T	G T C T A C T T T G	G C T T C T C T C G	A G A A C C T G G C	A A G A A A A A G A	C C T A C G T A C A	G C A C C T G C T G	A A G A A G A A C T	C C A A A T C C G T	G T G C G A C G C C
592NOS28	C A G T A T C A A G	A A G A A G A C G T	G C T T C A A G A T	G T C T A C T T T G	G G T T C T C T C G	A G G A C C T G G C	A A G A A A A A G A	C C T A C G T A C A	G C A C C T G C T G	A A G A A G A A C T	C C A A A T C C G T	G T G T G A C G C C
NOSb_Soff	C A G T A T C A A G	A A G A A G A C G T	G C T T C A A G A T	G T C T A C T T T G	G C T T C T C T C G	A G A A C C T G G C	A A G A A A A A G A	C C T A C G T A C A	G C A C C T G C T G	A A G A A G A A C T	C C A A A T C C G T	G T G C G A C G C C
592NOS9	C A G T A T C A A G	A A G A A G A C G T	G C T T C A A G A T	G T C T A C T T T G	G G T T C T C T C G	A G A A C C T G G C	A A G A A G A A G A	C C T A C G T A C A	G C A C C T G C T G	A A G A A G A A C T	C C A A A T C C G T	G T G T G A C G C C

	3130	3140	3150	3160	3170	3180	3190	3200	3210	3220	3230	3240
NOSa_Soff	A T T G T C C G A G	A A G G T G G A C A	C T T C T A T G T C	T G C G G T G A T G	T G C A A A T G G C	A T C C G A C G T G	T C T G A C A C C G	T C G A G A T G A T	T C T T A A A G A A	G A T G C T C C G A	T G T C A T C G G A	G G A G G C C A A A
592NOS28	A T T G T C C G A G	A A G G T G G A C A	C T T C T A T G T C	T G C G G T G A T G	T G C A A A T G G C	A T C C G A C G T G	T C T G A C A C C G	T C G A G A T G A T	T C T T A A A G A A	G A T G C T C C G A	T G T C A T C G G A	G G A G G C C A A A
NOSb_Soff	A T T G T C C G A G	A A G G T G G A C A	C T T C T A T G T C	T G C G G T G A T G	T G C A A A T G G C	A T C C G A C G T G	T C T G A C A C C G	T C G A G A T G A T	T C T T A A A G A A	G A T G C T C C G A	T G T C A T C G G A	G G A G G C C A A A
592NOS9	A T T G T C C G A G	A A G G T G G A C A	C T T C T A T G T C	T G C G G T G A T G	T G C A A A T G G C	A T C C G A C G T G	T C T G A C A C C G	T C G A G A T G A T	T C T T A A A G A A	G A T G C T C C G A	T G T C A T C G G A	G G A G G C C A A A

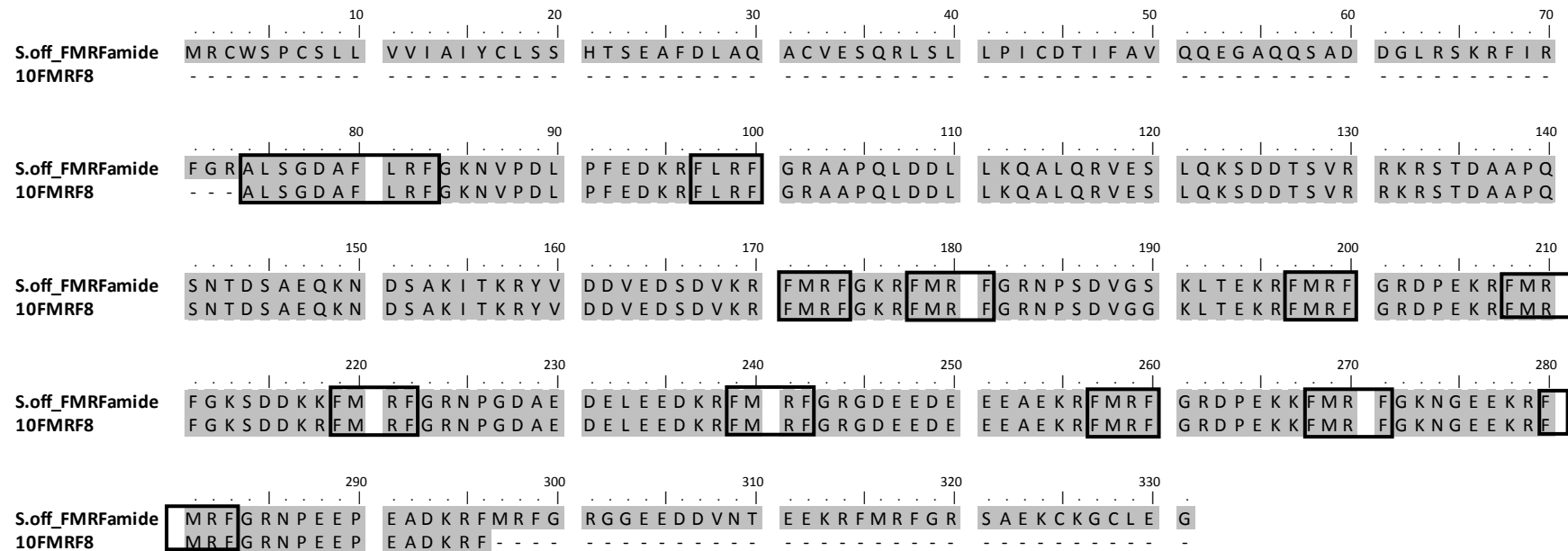
	3250	3260	3270	3280	3290	3300	3310	3320	3330	3340	3350	3360
NOSa_Soff	A A C T A T G T G C	T C A A A T T A C G	G G A T G C G A A C	C G T T T C C A T G	A A G A T A T C T T	T G G A G T T A C T	G T G A A A A G A T	C A A C G C C C A G	C T C C G T G G A T	A C A T C T G A C A	A A G T T C A T C T	G C G A T C A A A G
592NOS28	A A C T A T G T G C	T C A A A T T A C G	G G A T G C G A A C	C G T T T C C A T G	A A G A T A T C T T	T G G A	.....	C A A C G C C C A G	C T C C G T G G A T	A C A T C T G A C A	A A G T T C A T C T	G C G A T C A A A G
NOSb_Soff	A A C T A T G T G C	T C A A A T T A C G	G G A T G C G A A C	C G T T T C C A T G	A A G A T A T C T T	T G G A G T T A C T	G T G A A A A G A T	C A A C G C C C A G	C T C C G T G G A T	A C A T C T G A C A	A A G T T C A T C T	G C G A T C A A A G
592NOS9	A A C T A T G T G C	T C A A A T T A C G	G G A T G C G A A C	C G T T T C C A T G	A A G A T A T C T T	T G G A	.....	C A A C G C C C A G	C T C C G T G G A T	A C A T C T G A C A	A A G T T C A T C T	G C G A T C A A A G

	3370	3380	3390	3400	3410	3420
NOSa_Soff	G G G C G A T T C T	G G A A A G A A A A	T A A A A T T C T G	G A A T G C G A C G	A G G A A T T G C T	A A A G A A A T A A
592NOS28	.....	.....	.....	.....	.....	T G A
NOSb_Soff	G G G C G A T T C T	G G A A A G A A A A	T A A A A T T C T G	G A A T G C G A C G	A G G A A T T G C T	A A A G A A A T A A
592NOS9	.....	.....	.....	.....	.....	T G A

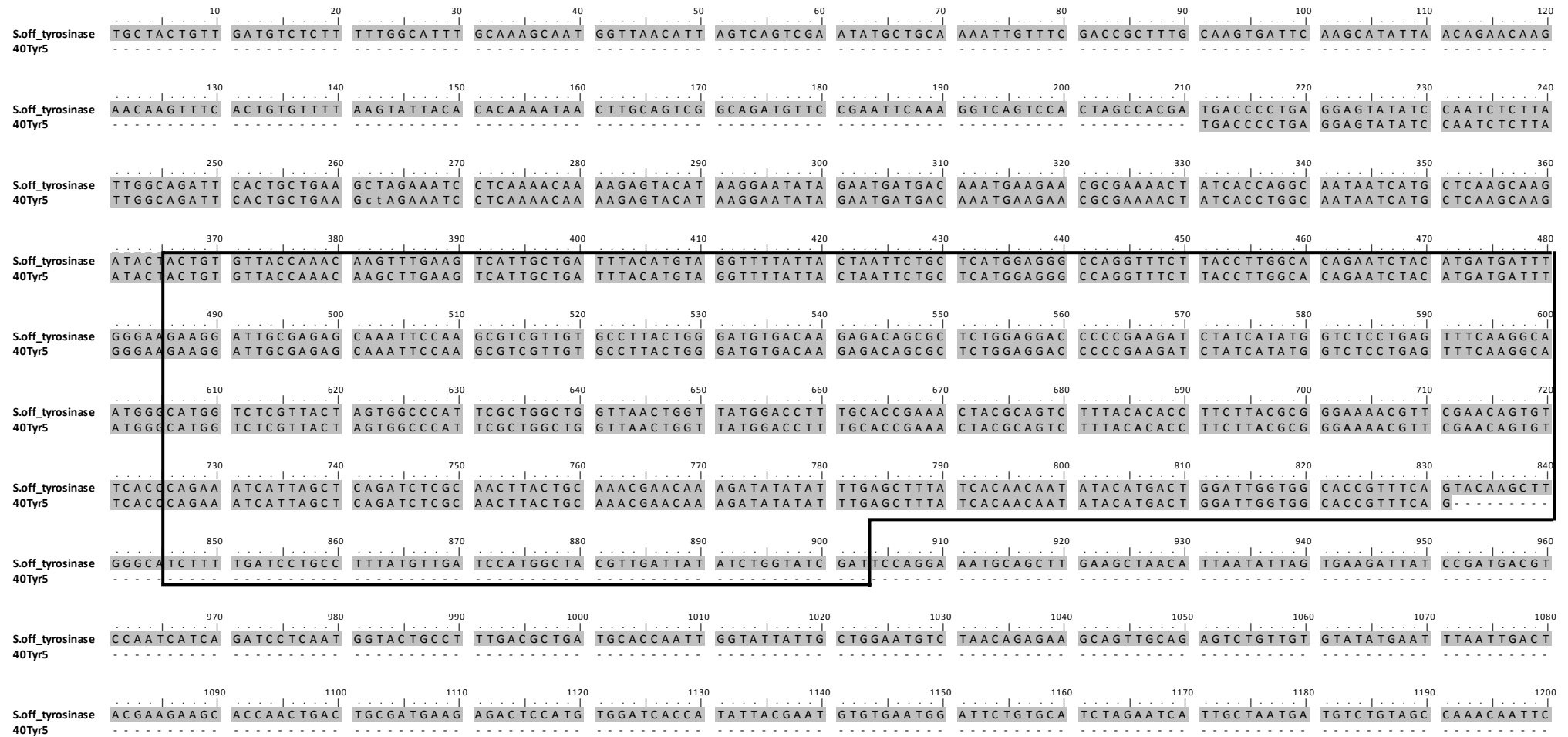


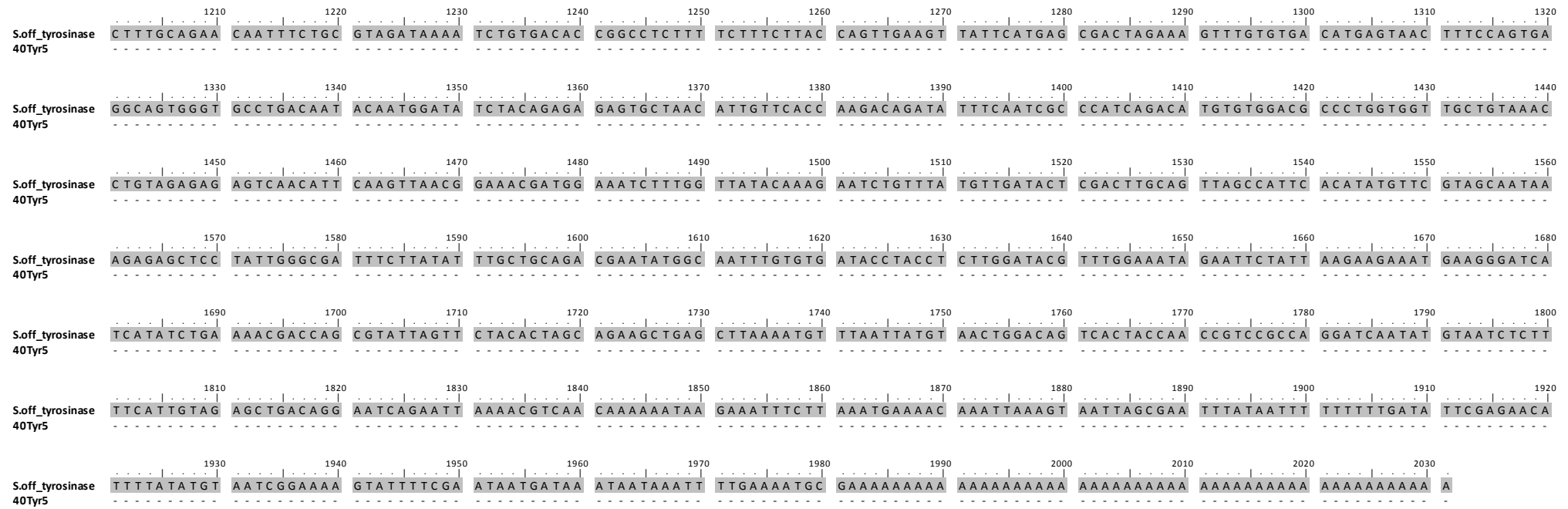
**Annexe A7** : Alignement de la séquence clonée avec la séquence d'ARNm de FaRP de *Sepia officinalis* (N° accession Y11246)



Les différents peptides codés par cette séquence sont encadré de noir.

**Annexe A8 : Alignement de la séquence clonée avec la séquence d'ARNm de la tyrosinase de *Sepia officinalis* (N° accession AJ297474.1)**





Le domaine central actif de la tyrosinase est représenté par un encart noir.

# Annexe A9

**A**

		10	20	30	40	50	60	70	80
gDNA_SoRef1	MNR FMNRWRP	PLNNMHNN							YYGRSMFN
cDNA_SoRef1	MNR FMNRWRP	<b>M</b> FNNMHNN							YYGRSMFN
gDNA_SoRef2	MNR SMNRWRP	MFN NMHNN							YYGRSMFN
cDNA_SoRef2	MNR SMNRWRP	MFN NMHNN							YYGRSMFN
gDNA_SoRef3	MNR FMNRWRP	MFN NMRNN		MYRG--RY	RGMMEPMSRM	TMD FQGRYMD	SQGRMVDPRY	YDYYGRWNDY	DRYYGRSMFN
cDNA_SoRef3	MNR FMNRWRP	MFN NMRNN		MYRG--RY	<b>R</b> GMMEPMSRM	TMD FQGRYMD	SQGRMVDPRY	YDYYGRWNDY	DRYYGRSMFN
gDNA_SoRef4	MNR YMNRFR	-----NWY	GNNYRG--RY	RGMMEPMSRM	TMD FQGRYMD	SQGRMVDPRY	YDYYGRWNDY	DRYYGRPMFN	
cDNA_SoRef4	MNR YMNRFR	-----NWY	GNNYRG--RY	<b>R</b> GMMEPMSRM	TMD FQGRYMD	SQGRMVDPRY	YDYYGRWNDY	DRYYGRPMFN	
gDNA_SoRef5	MNR YTMNRNP	-----MY	GNYRTGKKY	RGMMEPMSRM	TMD FQGRYMD	SQGRMVDPRY	NDYYGRWNDY	DRYYGRSMFN	
cDNA_SoRef5	MNR YTMNRNP	-----MY	GNYRTGKKY	<b>R</b> GMMEPMSRM	TMD FQGRYMD	SQGRMVDPRY	NDYYGRWNDY	DRYYGRSMFN	
gDNA_SoRef6	MNR FMNR YRP	MFN NMHNNMY	NNMYRG--RY	RGMMEPMSRM	TMD FQGRYMD	SQGRMVDPRY	YDYYGRWNDY	DRYYGKSMFN	
cDNA_SoRef6	MNR FMNR YRP	MFN NMHNNMY	NNMYRG--RY	<b>R</b> GMMEPMSRM	TMD FQGRYMD	SQGRMVDPRY	YDYYGRWNDY	DRYYGKSMFN	
		90	100	110	120	130	140	150	160
gDNA_SoRef1	YDWMMDGDRY	NRYYRWMDFP	ERYDMSGYQ	MDMYGRWMDM	QGHYYPFRQ	WGYQRHGYY	GFHYGSNMFY	PERWMDMSNY	
cDNA_SoRef1	YDWMMDGDRY	NRYYRWMDFP	ERYDMSGYQ	MDMYGRWMDM	<b>Q</b> GHHYYPFRQ	WGYQRHGYY	GFHYGSNMFY	PERWMDMSNY	
gDNA_SoRef2	YNWMDGDRY	NRYYRWMDFP	EYDMSGYQ	MDMYGRWMDM	HGRHCNPFQ	WGYQRHGYY	GFHYGSNMFY	PERWMDMSNY	
cDNA_SoRef2	YNWMDGDRY	NRYYRWMDFP	EYDMSGYQ	MDMYGRWMDM	<b>H</b> GRHCNPFQ	WGYQRHGYY	GFHYGSNMFY	PERWMDMSNY	
gDNA_SoRef3	YSWMDGDRY	NRYYRWMDFP	ERYDMSGYQ	MDMYGRWMDM	HGRHCNPFQ	WGYQRHGYY	GFHYGSNMFY	PERWMDMSHY	
cDNA_SoRef3	<b>Y</b> SWMDGDRY	NRYYRWMDFP	ERYDMSGYQ	MDMYGRWMDM	HGRHCNPFQ	WGYQRHGYY	GFHYGSNMFY	PERWMDMSHY	
gDNA_SoRef4	YSWMDGDRY	NRYYRWMDFP	ERYDMSGYQ	MDMYGRWMDM	QGRHCNPFQ	WGYQRHGYY	GFHYGSNMFY	PERWMDMSNY	
cDNA_SoRef4	YSWMDGDRY	NRYYRWMDFP	ERYDMSGYQ	MDMYGRWMDM	<b>Q</b> GRHCNPFQ	WGYQRHGYY	GFHYGSNMFY	PERWMDMSNY	
gDNA_SoRef5	YGP HMDGHQH	GG--WMDFP	ERWMDMSYQ	MDMQGRWMDM	QGRHCQPFQ	WGYNRHGNY	SSYYGRNMFY	PERWMDMSNW	
cDNA_SoRef5	<b>Y</b> GP HMDGHQH	GG--WMDFP	ERWMDMSYQ	MDMQGRWMDM	<b>Q</b> GRHCQPFQ	WGYNRHGNY	SSYYGRNMFY	PERWMDMSNW	
gDNA_SoRef6	YGWMDGDRY	NNYYRWMDFP	ERYDMSGYQ	MDMYGRWMDM	QGRHCNPFQ	WGHNRYGQSF	NNYGRNMFY	PERWMDMSNY	
cDNA_SoRef6	<b>Y</b> GWMDGDRY	NNYYRWMDFP	ERYDMSGYQ	MDMYGRWMDM	<b>Q</b> GRHCNPFQ	WGHNRYGQSF	NNYGRNMFY	PERWMDMSNY	
		170	180	190	200	210	220	230	240
gDNA_SoRef1	SMDMQGRYMD	RWGRHCNPF	FSHYYNHWNRYW	NHPGYNNHY	NRHMYPERY	FDMSNWQMDM	QGRWMDMQGR	HCNPYWYNWH	
cDNA_SoRef1	SMDMQGRYMD	RWGRHCNPF	FSHYYNHWNRYW	NHPGYNNHY	NRHMYPERY	FDMSNWQMDM	QGRWMDMQGR	HCNPYWYNWH	
gDNA_SoRef2	SMDMQGRYMD	RWGRHCNPF	FSHYYNHWNRYW	NHSGYNNYY	---MYPERY	YDMSNWQMDM	QGRWMDMQGR	HSNPYWYNWH	
cDNA_SoRef2	SMDMQGRYMD	RWGRHCNPF	FSHYYNHWNRYW	<b>N</b> HSGYNNYY	---MYPER <b>C</b>	YDMSNWQMDM	QGRWMDMQGR	HSNPYWYNWH	
gDNA_SoRef3	SMDMQGRYMD	RWGRHCNPF	FSHYYNHWNRYW	NHPGYNNHY	NRHMYPERY	FDMSNWQMDM	QGRWMDMQGR	HSNPYWYNWH	
cDNA_SoRef3	<b>S</b> MDMQGRYMD	RWGRHCNPF	FSHYYNHWNRYW	NHPGYNNHY	NRHMYPERY	FDMSNWQMDM	QGRWMDMQGR	<b>H</b> SDPYWYNWH	
gDNA_SoRef4	SMDMQGRYMD	RWGRHCNPF	FSHYYNHWNRYW	NHPGYNNYY	---MYPERY	YDMSNWQMDM	QGRWMDMQGR	HSNPYWYNWH	
cDNA_SoRef4	SMDMQGRYMD	RWGRHCNPF	FSHYYNHWNRYW	NHPGYNNYY	---MYPERY	YDMSNWQMDM	QGRWMDMQGR	<b>H</b> CNPYWYNWH	
gDNA_SoRef5	QMDTQGRWMD	MQGRYGSPFN	QWG--YNRHG	YYPGSSY	---GRNMYHPERW	MDMSNYQMDM	QGRWMDMHGR	HVNPFSHSMH	
cDNA_SoRef5	<b>Q</b> MDTQGRWMD	<b>M</b> QGRYGSPFN	QWG--YNRHG	YYPGSSY	---GRNMYHPERW	MDMSNYQMDM	QGRWMDMHGR	HVNPFSHSMH	
gDNA_SoRef6	SMDMQGRYMD	RWGRHCNPF	FSQNMNRYGYW	NYPGYNNYY	NRHMYPERY	FDMSNWQMDM	QGRWMDMQGR	HNNPYWYNWY	
cDNA_SoRef6	SMDMQGRYMD	RWGRHCNPF	FSQNMNRYGYW	NYPGYNNYY	NRHMYPERY	FDMSNWQMDM	QGRWMDMQGR	HNNPYWYNWY	
		250	260	270	280	290	300		
gDNA_SoRef1	GRHMYYPYQN	YYWYGRWDYP	--GMDYSNWQ	MD FQGRWMDN	HGRHMDP-WW	NEHYFNHYY*			
cDNA_SoRef1	GRHMYYPYQN	YYWYGRWDYP	--GMDYSNWQ	MD FQGRWMDN	HGRHMNP-WW	NEHYFNHYY*			
gDNA_SoRef2	GRHMYYPYQN	YYWYGRWDHH	--GMDYSNWQ	MD FQGRWMDN	HGRHMDP-WW	NEHYFNHYY*			
cDNA_SoRef2	GRHMYYPYQN	YYWYGRWDHH	--GMDYSNWQ	MD FQGRWMDN	HGRHMDP-WW	NEHYFNHYY*			
gDNA_SoRef3	GRHMYYPYQN	YYWYGRWDHH	--GMDYSNWQ	MD FQGRWMDN	HGRHMDP-WW	NEHYFNHYY*			
cDNA_SoRef3	GRHMYYPYQN	YYWYGRWDHH	--GMDYSNWQ	MD FQGRWMDN	HGRHMDP-WW	NEHYFNHYY*			
gDNA_SoRef4	GRHMYYPYQN	YYWYGRWDYP	--GMDYSNWQ	MD FQGRWMDN	QGRYMDPWWW	NDYYSYY*			
cDNA_SoRef4	GRHMYYPYQN	YYWYGRWDYP	--GMDYSNWQ	MD FQGRWMDN	QGRYMDPWWW	NDYYSYY*			
gDNA_SoRef5	GRNWSYPYQN	YYSRHMYP	ERNMDMSNWQ	MDMQGRWMDM	QGRHMDP SWS	NMHDNHYWF*			
cDNA_SoRef5	GRNWSYPYQN	YYSRHMYP	ERNMDMSNWQ	MDMQGRWMDM	QGRHMDP SWS	NMHDNHYWF*			
gDNA_SoRef6	GRQMYYPYQN	N-WYGRWDYP	--GMDYSNWQ	MDMQGRWMDM	QGRYMDP-WM	SDYSYNN*--			
cDNA_SoRef6	GRQMYYPYQN	N-WYGRWDYP	--GMDYSNWQ	MDMQGRWMDM	QGRYMDP-WM	SDYSYNN*--			

**B**

cDNA \ SoRef	SoRef1	SoRef2	SoRef3	SoRef4	SoRef5	SoRef6
gDNA						
SoRef1	97,94					
SoRef2		99,17				
SoRef3			99,66			
SoRef4				99,30		
SoRef5					100	
SoRef6						100

**Comparaison, deux à deux en acides aminés, des séquences de rélectines traduites à partir des séquences en ADNc et des séquences en ADNg.**

**A.** Alignement des séquences en acides aminés. Les différences entre les séquences sont surlignées en gris foncé. Les lignes noires représentent l'emplacement des sondes utilisées en ISH.

**B.** Tableau présentant le pourcentage d'identité entre les séquences d'ADNc et d'ADNg.

# Annexe A10

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
D_pealei_rlpA2	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRCHDHYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDFFPERYMDMSGYQMDM	HGRWMSDQGRYCNPMGHSW	----	SNRQGYYPG				
D_pealei_rlpA1	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRMHDHRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDNPERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
L_forbesi_mrrp1	EPMSRMSMDFQGRHMDSMDRMVDP	-----	GRWNDYDRYGRSTFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDNPERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG			
E_scolopes_1a	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRFNDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDFFPERYMDMSGYQMDM	HGRWMSDQGRYCNPMGHSW	----	SNRQGYYPG				
E_scolopes_1b	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRFNDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDNPERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
E_scolopes_3a	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRYNDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDFFPERYMDMSGYQMDM	HGRWMSDQGRYCNPMGHSW	----	SNRQGYYPG				
E_scolopes_2a	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRYNDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDNPERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
E_scolopes_2b	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRYNDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDNPERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
E_scolopes_2c	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRYNDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDNPERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
E_scolopes_2d	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRFNDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDFFPERYMDMSGYQMDM	HGRWMSDQGRYCNPMGHSW	----	SNRQGYYPG				
cDNA_SoRef1	-----	YYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDNPERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
cDNA_SoRef2	-----	YYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDNPERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
cDNA_SoRef3	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRWNDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDFFPERYMDMSGYQMDM	HGRWMSDQGRYCNPMGHSW	----	SNRQGYYPG				
cDNA_SoRef4	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRWNDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDNPERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
cDNA_SoRef5	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRWNDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDFFPERYMDMSGYQMDM	HGRWMSDQGRYCNPMGHSW	----	SNRQGYYPG				
cDNA_SoRef6	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRWNDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDNPERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
L_vulgaris_Ref3	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRWNDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDNPERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
L_vulgaris_Ref8	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRWYDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDNPERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
L_vulgaris_Ref12	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GKWDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDFFPERYMDMSGYQMDM	HGRWMSDQGRYCNPMGHSW	----	SNRQGYYPG				
L_vulgaris_Ref35	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GKWDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDNPERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
L_vulgaris_Ref11	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRWNDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDNPERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
L_vulgaris_Ref15	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRWNDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDNPERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
O_vulgaris_Ref15	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRWNDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDNPERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
O_vulgaris_Ref4	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GKWDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDNPERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
O_vulgaris_Ref8	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRWNDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDNPERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
O_vulgaris_Ref5	EPMSRMTMDFQGRYMSDQGRMVDPRYYDY	GRWNDYDRYGRSMFNYSQGNMDGQRYGG	----	WMDNPERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				

	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
D_pealei_rlpA2	..-SN	YGRNMFN	----	PERYMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
D_pealei_rlpA1	-YMSSHSMYGRNM	-YNPYHSHYASRHFDSP	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG					
L_forbesi_mrrp1	-YS	YGRNMFN	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
E_scolopes_1a	-YS	YGRNMFN	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
E_scolopes_1b	-YS	YGRNMFN	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
E_scolopes_3a	-YS	YGRNMFN	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
E_scolopes_2a	-YS	YGRNMFN	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
E_scolopes_2b	-YS	YGRNMFN	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
E_scolopes_2c	-YS	YGRNMFN	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
E_scolopes_2d	-YS	YGRNMFN	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
cDNA_SoRef1	-YH	YGSNMFY	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
cDNA_SoRef2	-FH	YGSNMFY	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
cDNA_SoRef3	-FH	YGSNMFY	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
cDNA_SoRef4	-YH	YGSNMFY	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
cDNA_SoRef5	SY	YGRNMFY	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
cDNA_SoRef6	-YN	YGRNMFY	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
L_vulgaris_Ref3	-YS	YGRNMFY	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
L_vulgaris_Ref8	-YS	YGRNMFY	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
L_vulgaris_Ref12	-YS	YGRNMFY	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
L_vulgaris_Ref35	-YS	YGRNMFY	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
L_vulgaris_Ref11	-YS	YGRNMFY	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
L_vulgaris_Ref15	-YS	YGRNMFY	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
O_vulgaris_Ref29	-YS	YGRNMFY	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
O_vulgaris_Ref15	-YS	YGRNMFY	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
O_vulgaris_Ref4	-YS	YGRNMFY	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
O_vulgaris_Ref8	-YS	YGRNMFY	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				
O_vulgaris_Ref5	-YS	YGRNMFY	----	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG				

	230	240	250	260	270	280
D_pealei_rlpA2	CNPFQGMWNNRHHGYYPGHPHGRNMFQ	PERWMDMSGYQMDM	QGRWMDAQGRFNNPFGQM	----	HGRQGHYPG	
D_pealei_rlpA1	NN	PYWY	----	GRNMYQP		
L_forbesi_mrrp1	CS	PYWNWYGRHMYYP				
E_scolopes_1a	CS	PYWNWYGRQMYYP				
E_scolopes_1b	CS	PYWNWYGRHMYYP				
E_scolopes_3a	CS	PYWNWYGRHMYYP				
E_scolopes_2a	CS	PYWNWYGRHMYYP				
E_scolopes_2b	CS	PYWNWYGRHMYYP				
E_scolopes_2c	CS	PYWNWYGRHMYYP				
E_scolopes_2d	CS	PYWNWYGRHMYYP				
cDNA_SoRef1	CN	PYWNWYGRHMYYP				
cDNA_SoRef2	SN	PYWNWYGRHMYYP				
cDNA_SoRef3	SD	PYWNWYGRHMYYP				
cDNA_SoRef4	CN	PYWNWYGRHMYYP				
cDNA_SoRef5	VN	PFSSHSHGRNWSYP				
cDNA_SoRef6	NN	PYWNWYGRQMYYP				
L_vulgaris_Ref3	CN	PYWNWYGRHMYYP				
L_vulgaris_Ref8	NN	PYWNWYGRHMYYP				
L_vulgaris_Ref12	NN	PYWNWYGRHMYYP				
L_vulgaris_Ref35	NN	PYWNWYGRNMYYP				
L_vulgaris_Ref11	NN	PYWNWYGRNMYYP				
L_vulgaris_Ref15	NN	PYWNWYGRNMYYP				
O_vulgaris_Ref29	NN	PYWNWYGRHMYYP				
O_vulgaris_Ref15	NN	PYWNWYGRNMYYP				
O_vulgaris_Ref4	NN	PYWNWYGRNMYYP				
O_vulgaris_Ref8	NN	PYWDWYRRHMFYR				
O_vulgaris_Ref5	NN	PYWNWYGRNMYYP				

Alignement de séquences de réflectines ayant servi à l'établissement de la phylogénie. Séquences de réflectines d'*Euprymna scolopes*, *Loligo forbesi*, *Doryteuthis pealii* provenant de la littérature. Et des séquences de réflectines de *Sepia officinalis*, *Octopus vulgaris* et *Loligo vulgaris*.

**Etude développementale et descriptive des structures tégumentaires à l'origine des motifs colorés chez *Sepia officinalis***

Les céphalopodes Coléoides (seiches, calmars, pieuvres) sont les organismes dont les capacités à changer d'apparence et de couleurs pour communiquer ou se camoufler, sont les plus élaborées. Ces capacités sont étroitement corrélées au mode et au milieu de vie des espèces considérées. Leur tégument contient trois structures cellulaires spécifiques que sont les chromatophores (organes neuromusculaires pigmentaires), les iridophores (producteurs d'iridescence) et les leucophores (responsables de la composante blanche des motifs). Ce travail de thèse utilise les différentes approches (biochimiques, histologiques et génétiques) pour étudier, chez *Sepia officinalis*, la mise en place de ces différentes structures au cours du développement embryonnaire et contribuer à la compréhension des mécanismes d'évolution des ornements chez les Coléoides. Concernant les chromatophores, nous décrivons la dynamique de leur apparition. Un lien entre neurones à FMR/Famides et développement des chromatophores est également proposé. Une approche par RPE nous a permis de proposer la présence de mélanines/phéomélanine au niveau de la peau. Le problème de la mise en évidence précoce des chromatophores (expression d'ARN "marqueurs") est abordé et discuté. Concernant les iridophores, dont les propriétés optiques sont dues à la production de protéines spécifiques (les réflectines), leur mise en place est décrite pour la première fois. Nous prouvons l'existence de 6 gènes de réflectines chez *S. officinalis* et démontrons que cette diversité n'est pas associée à une expression tissu-spécifique. Les gènes de réflectines d'autres espèces de céphalopodes ont été séquencés et une première analyse phylogénétique démontre une histoire évolutive complexe impliquant une diversification potentielle de trois formes ancestrales de réflectines putatives.

*Mots Clés* : *Sepia officinalis*, céphalopode, développement, chromatophore, iridophore, réflectine

---

**Developmental and descriptive study of the tegumentary structures involved in colour patterning in *Sepia officinalis***

Coleoid Cephalopods (cuttlefishes, squids, octopuses) are the organisms with the most developed abilities to change their shape and colour, mostly for communication and camouflage. Their integument possesses three specific cellular structures, namely chromatophores (neuromuscular and pigmentary organs), iridophores (providing iridescence) and leucophores (providing the white background of patterns). This work applied different approaches (biochemistry, histology and genetic), in *Sepia officinalis*, to study the development of these structures and to understand how colour patterns have closely evolved with both life history and ecological niche in each coleoid group. Regarding chromatophores, we describe their developmental dynamic. A link between FMRF-amide neurons and chromatophore development is discussed. RSE analysis tends to confirm the presence of melanins in chromatophores. The difficulty to investigate the development of chromatophores (through ARN expression) is described and discussed. Regarding iridophores (the optical properties which are due to the production of specific proteins called reflectines), we describe their developmental dynamic for the first time. We demonstrate the occurrence of six different reflectin genes in *S. officinalis* and show that their expression is not tissue or organ specific. Reflectin genes in other cephalopod species have been sequenced and our preliminary phylogenetical analyse point up a complex evolutionary history with the potential diversification of three putative ancestral reflectin forms.

*Key words*: *Sepia officinalis*, cephalopod, development, chromatophore, iridophore, reflectin