

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

ÉCOLE DOCTORALE DIVERSITÉ DU VIVANT

Par **Auxane BURESI**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE DE L'ÉVOLUTION ET DU DÉVELOPPEMENT

**APPROCHE EVO-DEVO DE LA DIFFÉRENCIATION ET DE
LA RÉGIONALISATION DU SYSTÈME NERVEUX CHEZ LA
SEICHE *SEPIA OFFICINALIS***

Directrice de recherche : Laure BONNAUD-PONTICELLI

Co-encadrant : Sébastien BARATTE

Soutenue le : 17 septembre 2013

Devant la commission d'examen formée de :

M. Eric QUEINNEC

PR, Université Pierre et Marie Curie Paris 6

Mme. Catherine PASQUALINI-LAM

CR, CNRS

M. Michel VERVOORT

PR, Université Paris Diderot Paris 7

Mme. Christelle JOZET-ALVES

MCU, Université de Caen Basse-Normandie

M. Patrick LAURENTI

MCU, Université Paris Diderot Paris 7

M. Sébastien BARATTE

MCU, Université Paris Sorbonne Paris 4

Mme. Laure BONNAUD-PONTICELLI

MCU, HDR, Université Paris Diderot Paris 7

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Co-Encadrant de thèse

Directrice de thèse

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté de consacrer de leur temps à évaluer mon travail. Merci au Professeur Eric Quéinnec, qui m'a également permis d'intégrer le laboratoire au cours de mon master 2 et qui a toujours montré de l'intérêt pour mon travail lors de nos rencontres. Merci à Monsieur Patrick Laurenti et à Madame Christelle Jozet-Alves, de m'avoir suivi durant ma thèse en tant que membres de mon comité, et d'avoir ainsi pris part à mes réflexions, à mes avancées, et de m'avoir permis de prendre du recul sur mon travail. Merci au Professeur Michel Vervoort et à Madame Catherine Pasqualini-Lam, rapporteurs à qui a été confiée la tâche de lire et de juger ce manuscrit.

C'est au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris que j'ai mené mes travaux des années 2010 à 2013. Durant ces trois années, c'est avec fierté que j'ai parlé bien souvent de mon lieu de travail. En tant que biologiste, travailler dans cette institution scientifique de rayonnement international représentait une chance incroyable dans mon parcours, mais bien plus que cela, sur le plan personnel, c'était l'aboutissement d'une profonde aspiration. Merci au Muséum de m'avoir accueilli dans ses locaux, un peu usés par le temps et dans un environnement chargé d'histoire, et où il m'était possible de méditer à mes pérégrinations céphalopodesques au pied du Platane de Buffon. Cet établissement restera dans mon cœur quelle que soit la route qui s'ouvrira désormais à moi. Merci au Professeur Gilles Bœuf, président du Muséum, et au professeur Guy Duhamel de m'avoir reçue au sein du Département des Milieux et Peuplements Aquatiques. Je remercie également le professeur Hervé Le Guyader de m'avoir offert l'opportunité d'effectuer ma thèse dans le cadre de son école doctorale Diversité du vivant. Merci à Sylvie Dufour pour son accueil chaleureux dans l'UMR BOREA, ainsi qu'à tous les membres de son équipe pour leur écoute et leurs conseils en particulier durant mes présentations lors des rendez-vous de l'UMR.

Je remercie de tout cœur ma directrice de thèse Madame Laure Bonnaud-Ponticelli, qui m'a offert l'opportunité de travailler dans son équipe. Merci à toi de m'avoir permis de découvrir ce modèle extraordinaire que constitue la seiche et de m'avoir fait ainsi rentrer dans la petite communauté céphalopodiste. Je pense avoir un pincement au cœur lorsqu'il faudra dire au revoir à ce bel animal ! Merci pour nos discussions, durant lesquelles nous n'avions pas peur de ne pas toujours être d'accord, sans que cela ne cause jamais d'amertume. Merci Laure

d'avoir eu confiance en mes capacités et de l'enthousiasme réel autour de mes résultats durant ces trois années. Merci aussi de toujours m'avoir mis des petits chocolats sur mon bureau à Pâques...

J'exprime ma profonde gratitude à mon co-directeur Monsieur Sébastien Baratte qui a été tout le long de mon parcours un merveilleux professeur. Au-delà d'un simple suivi, Sébastien m'a enseigné le métier de chercheur, et m'a permis de prendre pleinement conscience de cette vocation abstraite. Il m'a soutenu, appris à penser « scientifiquement », et surtout il m'a fait partager sa passion, en ne se montrant jamais avare de ces connaissances. Sébastien m'a toujours considéré en tant que chercheuse, et, même si nous n'étions pas toujours d'accord, notre entente et notre complicité est restée inchangée. Merci Sébastien d'avoir été là et de m'avoir fait autant rire, j'ai eu beaucoup de chance d'avoir pu compter sur toi.

Je tiens à remercier les autres membres de l'équipe. Aude Andouche, toi qui m'a permis d'acquérir une meilleure maîtrise technique et surtout une rigueur lors du travail expérimental en laboratoire. Merci également d'avoir été là pour les petits moments de détente et de discussion que nous avons partagés. Merci à Yann Bassaglia avec qui j'ai eu le réel plaisir de partager « mon » bureau. Yann, au-delà d'être le Mc Gyver du laboratoire, tu es mon mentor spirituel. J'ai toujours apprécié les discussions scientifiques que nous avons ensemble. Tu as toujours été enthousiaste devant mes résultats, et surtout tu as toujours cru en moi, me permettant plus d'une fois de reprendre confiance en moi lorsque je ne me sentais pas capable.

Je remercie M. Sébastien Henry de la station marine de Roscoff (UPMC), ainsi que M. Joël Henry et M. Ludovic Dickel de la station marine de Luc/mer (Université de Caen), pour nous avoir procuré de nombreux œufs de seiche.

Je tiens aussi à remercier tous les stagiaires qui sont passés dans l'équipe : Coralie, Baptiste, Lidvine, Guillaume, Mellissandre, Lesli, Angélique, Arthur et Louis avec qui nous avons partagé notre passion commune pour la biologie.

Je remercie toute ma famille, qui a toujours montré de l'intérêt pour mon travail malgré une grande incompréhension de son « but ultime », et entraînant par conséquent beaucoup de rire qui me faisait prendre du recul. Merci tout particulièrement à mes parents, ma mère chérie, mon père et bien sûr Jean-Pierre pour leur accompagnement, leur soutien et pour l'admiration

qu'ils ont toujours porté à mon travail. Je ne saurais oublier ma si chère grand-mère qui est partie un peu trop tôt. Mamie, je sais combien tu étais impatiente que je te raconte tous le travail que j'ai pu mener ici, et que je n'ai pas vraiment eu l'occasion de t'exposer, pensant que j'avais tout le temps. Je n'imaginai pas vivre ce moment sans toi. Si le destin en a subitement décidé autrement, tu m'as été très présente dans la finalisation de ce manuscrit. Lors des instants d'incertitudes, être dans la création – comme tu m'as appris – c'est cela aussi qui m'a permis d'avancer. Tout viendra quand les choses doivent venir et au mieux...

Je tiens enfin à remercier tout particulièrement mon compagnon, Bernard. Tu as été d'un soutien sans faille dans cette dernière ligne droite longue et difficile, je n'aurais pu rêver meilleur accompagnement. Merci pour tous les petits plats que tu m'as mijoté durant cette interminable épreuve de rédaction, et qui m'ont presque fait hésiter à finaliser mon manuscrit. Tu m'as permis de reprendre confiance en moi lors des instants les plus pénibles, et tu m'as toujours rappelé que je n'étais pas seule à tes côtés. Merci d'avoir été si gentil et solidaire.

Pour finir, je ne pourrais oublier de remercier mère Nature pour le bonheur qu'elle m'apporte depuis les premières années de ma vie. Je n'ai pas fini de la contempler et de m'extasier devant elle. Merci particulièrement aux petites seiches de m'avoir permis de contribuer, à mon échelle, à l'étude de la compréhension du vivant.

TABLE DES MATIERES

PARTIE I : INTRODUCTION GENERALE	9
Diversité des plans d'organisations et des systèmes nerveux : l'approche Evo-Dévo.....	11
CHAPITRE 1 : Evolution du système nerveux	17
I Définitions générales et hypothèses évolutives.....	17
1- Qu'est-ce qu'un système nerveux ?.....	17
2- La centralisation du SN, quelles hypothèses évolutives ?.....	23
II Intérêts des mollusques en Evo-Dévo du système nerveux	26
CHAPITRE 2 : Présentation du modèle <i>Sepia officinalis</i>	31
I Classification phylogénétique	31
II Anatomie générale.....	35
III Habitat et cycle de vie	37
IV Développement embryonnaire	39
V Orientations et plans d'organisations	46
VI Le système nerveux juvénile et adulte	48
1- Organisation générale	48
2- Le cerveau et les lobes optiques	50
3- Ganglions périphériques et systèmes sensoriels	52
VII Le système nerveux embryonnaire.....	54
CHAPITRE 3 : Neurogenèse comparative chez les bilatériens	61
I Détermination du neuroectoderme	61
II Détermination des progéniteurs neuraux.....	67
III Spécification neuronale	70
1- La régionalisation antéro-postérieure	73
2- La régionalisation médio-latérale : un rôle majeur des gènes columnaires.....	80
IV Différenciation neurale.....	90
PROBLEMATIQUES DE THESE.....	93

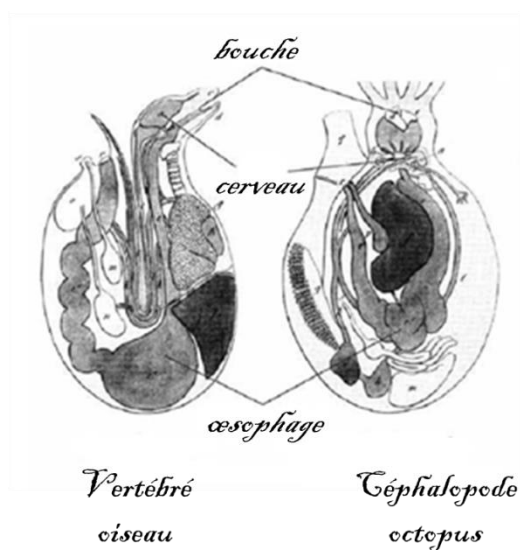
PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSION	95
CHAPITRE 1 : Dynamique de différenciation neurale chez <i>Sepia officinalis</i>	97
I Etude de l'expression du gène <i>Sof-elav1</i>	99
II Etude de l'expression du gène <i>Sof-msi</i>	111
III Interprétations	121
CHAPITRE 2 : Dynamique de régionalisation chez <i>Sepia officinalis</i>	123
I Régionalisation médio-latérale	127
1- Etude de l'expression du gène <i>Sof-nk2.1</i>	127
2- Etude de l'expression du gène <i>Sof-gsx</i>	134
3- Etude de l'expression du gène <i>Sof-pax6</i>	139
4- Etude de l'expression de <i>Sof-pax3/7</i>	144
5- Interprétations	153
II Régionalisation antéro-postérieure	157
1- Etude de l'expression de <i>Sof-otx2</i>	157
2- Etude de l'expression de <i>Sof-pax2/5/8</i>	160
3- Interprétations	168
III Régionalisation des yeux et des bras en développement	171
1- Le développement des yeux : entre conservations d'expressions géniques et spécificités moléculaires	172
2- Le développement des bras, des membres « à part »	179
CONCLUSION GENERALE	189
PARTIE III : MATERIEL ET METHODES	195
I Conditionnement du matériel biologique	197
II L'hybridation <i>in situ</i> ou HIS	198
ARTICLES.....	207
ANNEXES	279
BIBLIOGRAPHIE	303

PARTIE I : INTRODUCTION

GENERALE

DIVERSITE DES PLANS D'ORGANISATIONS ET DES SYSTEMES NERVEUX : L'APPROCHE EVO-DEVO

Le plan d'organisation particulier des céphalopodes (de *képhalé*, tête et *podos*, pied en grec) suscite de nombreux questionnements, et l'absence de divisions de leur corps avait déjà été relevée à l'époque d'Aristote. Nul n'ignore désormais que les céphalopodes sont capables de surprenantes capacités cognitives et possèdent un système nerveux particulièrement complexe. Cela leur a valu de faire souvent l'objet de comparaisons avec les vertébrés. En 1830, les naturalistes Meyranx et Laurencet ont démontré, qu'à une torsion près, les organes d'une seiche présentent une disposition relative identique à celle des vertébrés. Les observations des deux scientifiques furent largement encouragées et reprises par Geoffroy Saint-Hilaire (1772-1844) dans le but d'appuyer sa théorie d'une unicité de plan structural et de leurs composés chez tous les animaux.



Cuvier (1769-1832), en désaccord avec Geoffroy Saint-Hilaire, soutenait l'idée d'un plan par embranchement. Cuvier comparait ainsi dans son article *Considération sur les mollusques et en particulier les Céphalopodes* un vertébré courbé en U avec un poulpe, afin de soutenir sa propre théorie : fixité des formes et similitudes issues de contraintes prédéfinies expliquant l'analogie des organes (**Fig.1**).

Figure 1 : Comparaison de l'organisation des organes internes entre un oiseau et un céphalopode. Cuvier réalisa cette figure pour supporter sa vision fonctionnaliste opposée aux théories de Geoffroy Saint-Hilaire. Il « place la fonction avant la structure et infère de la fonction ce que sera l'organe » (Russell, 1916). La face dorsale de l'*Octopus* correspond à la face ventrale de l'oiseau. D'après Cuvier, 1830.

Le conflit entre les deux hommes s'inscrit dans un cadre historique traversé par de multiples courants de pensées. La diversité des formes et des systèmes chez les métazoaires se conçoit aujourd'hui sous l'angle de l'évolution, mais cela n'a pas toujours été le cas. Si l'idée de

l'unicité d'un plan d'organisation commun à tous les animaux soutenue par Geoffroy Saint-Hilaire était visionnaire, il n'en restait pas moins que celui-ci considérait la diversité comme étant le produit de différentes combinaisons prédéfinies, tous les animaux disposant d'un registre unique de choix parmi différentes formes possibles, illustrées par la progression des stades du développement embryonnaire. Avec cette conception finalisée de la succession des formes vivantes, Geoffroy Saint-Hilaire n'était pas un évolutionniste malgré ses idées novatrices pour l'époque (Le Guyader, 1998).

Jusqu'au XVIII^e siècle, la biodiversité était considérée comme le résultat d'une création divine, et en conséquence perçue comme une réalité objective et immuable. Les notions d'espèces et de compétition pour la survie avaient certes été énoncées dès l'antiquité, notamment par Aristote dans *l'Histoire des animaux* et par Lucrèce dans *De natura rerum*, mais le concept d'évolution, sous tendant une variation des formes vivantes à la fois temporelle et dynamique, n'est apparu qu'au XIX^e siècle.

Charles Darwin (1809-1882), dans son ouvrage *L'origine des espèces* paru en 1859, et Alfred Russel Wallace (1823-1913) sont les premiers à proposer la théorie de la sélection naturelle, fondatrice de notre conception moderne de l'évolution et de ses mécanismes. Cette théorie soutient que les espèces évoluent dans le temps, engendrant progressivement de nouvelles espèces ou disparaissant, la sélection naturelle étant l'un des moteurs de ces changements. La théorie de la sélection naturelle ouvre alors la voie à des questionnements sur l'origine et la parenté des organismes vivants.

Cette théorie fut la cible de maintes résistances politiques, sociales, philosophiques et religieuses, mais également scientifiques. Pour Pierre-Paul Grassé par exemple (1895-1985), l'évolution ne dépend pas des forces physiques extérieures à l'être vivant, mais s'oriente en fonction d'une dynamique interne propre vers un accroissement de la complexité des organismes, se rapprochant ainsi des idées de Lamarck (1744-1829). Le mouvement créationniste, en réaction à la théorie de la sélection naturelle, défend encore l'origine divine de tout être vivant.

La théorie de la sélection naturelle a eu aussi ses partisans. Thomas Henry Huxley (1825-1895), publia en 1863 *La Place de l'homme dans la nature* dans lequel il développa la thèse que les singes anthropoïdes sont nos proches parents. Ernst Haeckel (1834-1919) se basa sur les travaux de Karl Ernst von Baer, père de l'embryologie (1792-1876), et postula que « l'ontogénèse récapitule la phylogénèse ». Partant du constat que les embryons de différentes espèces

présentent des ressemblances entre elles qui ne se retrouvent pas forcément entre les adultes, il avança que les différents stades du développement de l'embryon illustreraient la chronologie de l'évolution des formes et des systèmes. Ces observations illustrent pour la première fois l'importance du développement embryonnaire dans la compréhension de l'évolution.

En complément de ces études descriptives et comparatives, les notions d'hérédités mises en évidence par Gregor Mendel (1822-1884), et de mutations par Thomas Hunt Morgan (1866-1945, prix Nobel en 1933) apportent une première compréhension génétique de la dynamique de l'évolution. Avec ces travaux, on comprend désormais l'importance des mutations, qui peuvent avoir des conséquences significatives sur l'anatomie et le développement d'un animal tel que la drosophile. Mais c'est la découverte de l'ADN, comme support de l'hérédité dans les années 40 (Oswald Avery) puis du code génétique dans les années 60 (Marshall Nirenberg, Har Gobind Khorana, Robert W. Holley) qui vont permettre d'appréhender pleinement la mécanique de l'évolution.

L'ensemble de ces découvertes, complété par des données mathématiques, paléontologiques ou géologiques révèlent, au-delà des avancées techniques qui ont marqué ce siècle, un véritable changement dans la manière d'aborder le vivant, notamment vis-à-vis de la place de l'Homme dans cette diversité. Initiée par la publication de *La génétique et l'origine des espèces* (Dobzhansky, 1937), la théorie synthétique de l'évolution, ou néo-darwinisme, constitue ainsi depuis les années 40 le cadre conceptuel central adopté officiellement par la communauté scientifique internationale.

Notons cependant que depuis les années 70, on assiste à une remise en question du principe de l'évolution graduelle dans cette théorie, principe qui stipule que les changements morphologiques surviendraient graduellement par accumulation de modifications très lentes et continues résultant du jeu des mutations et de la sélection naturelle. Ainsi, l'émergence de la théorie des équilibres ponctués soutient la thèse de « sauts » évolutifs rapides, conséquence de mutations neutres au regard de la sélection naturelle (Gould & Elredge, 1972).

La découverte des gènes homéotiques dans les années 80 va considérablement améliorer la compréhension des mécanismes du développement et de l'évolution (Gould, 1985 ; Heffer & Pick, 2013). L'étude des gènes du développement révèle que ce sont des processus moléculaires homologues (hérités d'un ancêtre commun) qui contrôlent des étapes développementales similaires dans la mise en place du plan d'organisation chez deux modèles « phares » (la drosophile et la souris). Cette dernière découverte d'une unicité moléculaire de contrôle a

permis de faire le lien entre la génétique, le développement et l'évolution, en reliant directement l'ontogenèse (les mécanismes embryologiques) avec la phylogénèse.

Ces apports vont définitivement instaurer la discipline émergente de la biologie du développement et de l'évolution, ou Evo-Dévo. Comme la définit Müller (2007), « la biologie du développement et de l'évolution (Evo-Dévo) explore les relations mécanistiques entre les processus de développement des individus et des changements phénotypiques au cours de l'évolution ». L'Evo-Dévo vise ainsi à retracer l'émergence et l'évolution de la diversité du monde vivant par l'étude et la comparaison, chez différentes espèces, des caractères embryologiques et des processus qui gouvernent leur développement. Elle s'inscrit tant bien à l'échelle des espèces, des organes et des systèmes, que des types cellulaires et des voies moléculaires. En effet, les avancées méthodologiques telles que les techniques de clonage de gènes et de visualisation d'activité génique dans les tissus embryonnaires ont facilité l'émergence de cette nouvelle discipline, en permettant notamment la comparaison des processus de développement dans différents taxons au niveau moléculaire.

Ma thèse s'inscrit dans le cadre général de l'Evo-Dévo du système nerveux chez les eumétazoaires. Actuellement, les mécanismes sous-tendant la mise en place des systèmes nerveux, dont les différents agencements sont liés aux plans d'organisations, sont au centre de réflexions évolutives et développementales. L'origine de la centralisation nerveuse pose notamment question (Holland, 2003 ; Lowe et al., 2003 ; Moroz, 2009 ; Arendt, 2009). Ces processus de développement sont assez bien connus chez les vertébrés, les insectes, et depuis peu chez les annélides. Leur étude a révélé de nombreuses similitudes, en particulier sur le plan moléculaire. Bien que présentant des systèmes nerveux nettement centralisés, les mollusques, et en particulier les céphalopodes, sont encore largement sous représentés dans ces études. Par rapport aux groupes étudiés en Evo-Devo que sont les arthropodes et les vertébrés, les mollusques présentent des plans d'organisation particulièrement originaux qui peuvent apporter un éclairage nouveaux aux hypothèses évolutives concernant les plans d'organisation et les systèmes nerveux (Article n°4 ; Article n°5).

Le système nerveux des céphalopodes présente en effet le cerveau le plus complexe du monde des non-vertébrés. Ces animaux sont capables de comportements sophistiqués (Hochner et al., 2003). Ils possèdent des capacités d'apprentissage et de mémorisation remarquables (Huang & Chiao, 2013) et il semblerait qu'ils aient une conscience particulière de leur environnement (Mather, 2008). Les céphalopodes présentent des états émotionnels variables, se traduisant notamment par des variations quasi-instantanées de leur patterns colorés, sous

contrôle direct du système nerveux (Budelmann, 1998 ; Broom, 2007). Ce système nerveux se met en place *via* un développement direct téléolécithe contrairement aux autres mollusques. Avec leurs spécificités nerveuse, développementale, et leur plan d'organisation dérivé, les céphalopodes constituent depuis quelques années des modèles émergent en Evo-Dévo. Ce manuscrit relate le travail que j'ai mené sur le développement du système nerveux de *S. officinalis* durant ma thèse. Je me suis appuyée sur des gènes connus pour être impliqués dans ces processus de neurogenèse chez d'autres espèces, il s'agit donc d'une approche comparée. En plus de participer à la compréhension de la neurogenèse de ce céphalopode, mon étude s'inscrit dans le contexte du questionnement général de l'évolution du système nerveux, lui-même lié à celui de la diversité des plans d'organisation.

Les premières pages de ce manuscrit visent ainsi à aborder les questions évolutives liées au système nerveux, en présentant notamment les hypothèses actuelles de l'origine de la centralisation nerveuse.

CHAPITRE 1 :

EVOLUTION DU SYSTEME NERVEUX

I Définitions générales et hypothèses évolutives

1- Qu'est-ce qu'un système nerveux ?

L'une des synapomorphies majeures des eumétazoaires (**Fig. 2**) est qu'ils possèdent un système nerveux, caractérisé par la présence de cellules nerveuses (ou neurones) et de synapses. Le système nerveux comprend tous les neurones d'un organisme, et peut inclure des cellules gliales et des cellules accessoires, lesquelles, par exemple, servent de structures de support, de guidage, ou de protection aux neurones (Richter et al., 2010).

Les Spongiaires (appartenant aux métazoaires) ne possèdent pas de cellules nerveuses, même si ils sont capables de conceptions d'informations *via* des signaux électriques (Lawn et al., 1981). Ce groupe comporte néanmoins des composants moléculaires retrouvés habituellement dans le système nerveux : de l'immuno-réactivité contre la sérotonine a ainsi été mise en évidence (Weyrer et al., 1999), ainsi que des molécules typiques du système sensoriel des métazoaires (récepteur au glutamate chez *Geodia cydonium*) (Müller & Müller, 1999), mais dont les fonctions restent encore à élucider.

Chez les eumétazoaires, le système nerveux s'organise soit sous la forme d'un réseau diffus de cellules nerveuses, soit sous la forme de ganglions, lobes et cordons nerveux. Chez les Cnidaires, le système nerveux est couramment décrit comme étant diffus (Pantin, 1952). Il s'avère cependant que dans ce groupe la distribution des neurones n'est pas aléatoire et uniforme, et peut révéler la présence d'anneaux nerveux ou de réseaux de cellules ganglionnaires agglomérées, traduisant une concentration des neurones dans la région apicale de nombreuses espèces (Galliot & Quiquand, 2011). Chez les bilatériens, le système nerveux (SN) est fréquemment qualifié de centralisé et se régionalise généralement le long des axes antéro-postérieur et dorso-ventral. Chez les vertébrés, un tube neural, issu de l'invagination d'une plaque neurale neuro-ectodermique, constitue le système nerveux central (SNC) alors que les nerfs qui parcourent l'organisme constituent le système nerveux périphérique (SNP).

Chez les non-vertébrés, d'après Bullock & Horridge (1965) le SNC « est une partie du SN qui forme une concentration distincte de cordons nerveux ou de ganglions ». Chez les insectes, le SNC se réfère souvent aux ganglions céphaliques et à la chaîne ganglionnaire ventrale, issue de l'internalisation de neuroblastes. De manière générale, les ganglions correspondent à une agglomération de neurones, associés parfois à des cellules gliales. Dans les ganglions, les neurones présentent une organisation spécifique : les corps cellulaires des neurones se localisent à la surface du ganglion, formant le cortex cellulaire, tandis que les neurites (axones, dendrites) sont concentrés au centre des ganglions, formant ainsi le neuropile (Richter et al., 2010).

Le terme de SNC implique une référence à un axe proximal-distal, définissant le centre et la périphérie d'un organisme, le SNC étant internalisé (Richter et al., 2010). Cette définition est très large et est assez problématique car des condensations de neurites peuvent être localisées en périphérie des organismes, et des zones moins condensées en partie interne peuvent être retrouvées. De plus, cette définition pourrait tout à fait s'étendre à des métazoaires non bilatériens chez lesquels sont également observés des condensations de ganglions. Ainsi les définitions de SNC comportent des limites et les terminologies SNC/SNP sont assez variables en fonction des espèces.

Outre ces processus de centralisation nerveuse, de nombreuses espèces de bilatériens présentent une condensation poussée de neurones généralement associée à la partie antérieure où se regroupent les récepteurs sensoriels (structures photosensibles, bouche, organes olfactifs...), conséquence de la céphalisation. Certaines de ces espèces disposent alors d'un cerveau, issu du processus de cérébralisation. Encore aujourd'hui, le cerveau est souvent associé à l'intelligence, à la complexité du traitement de l'information, aux capacités cognitives, à un état de conscience... Cette tendance à assimiler le cerveau à l'intellect résulte évidemment d'une vision anthropocentrée.

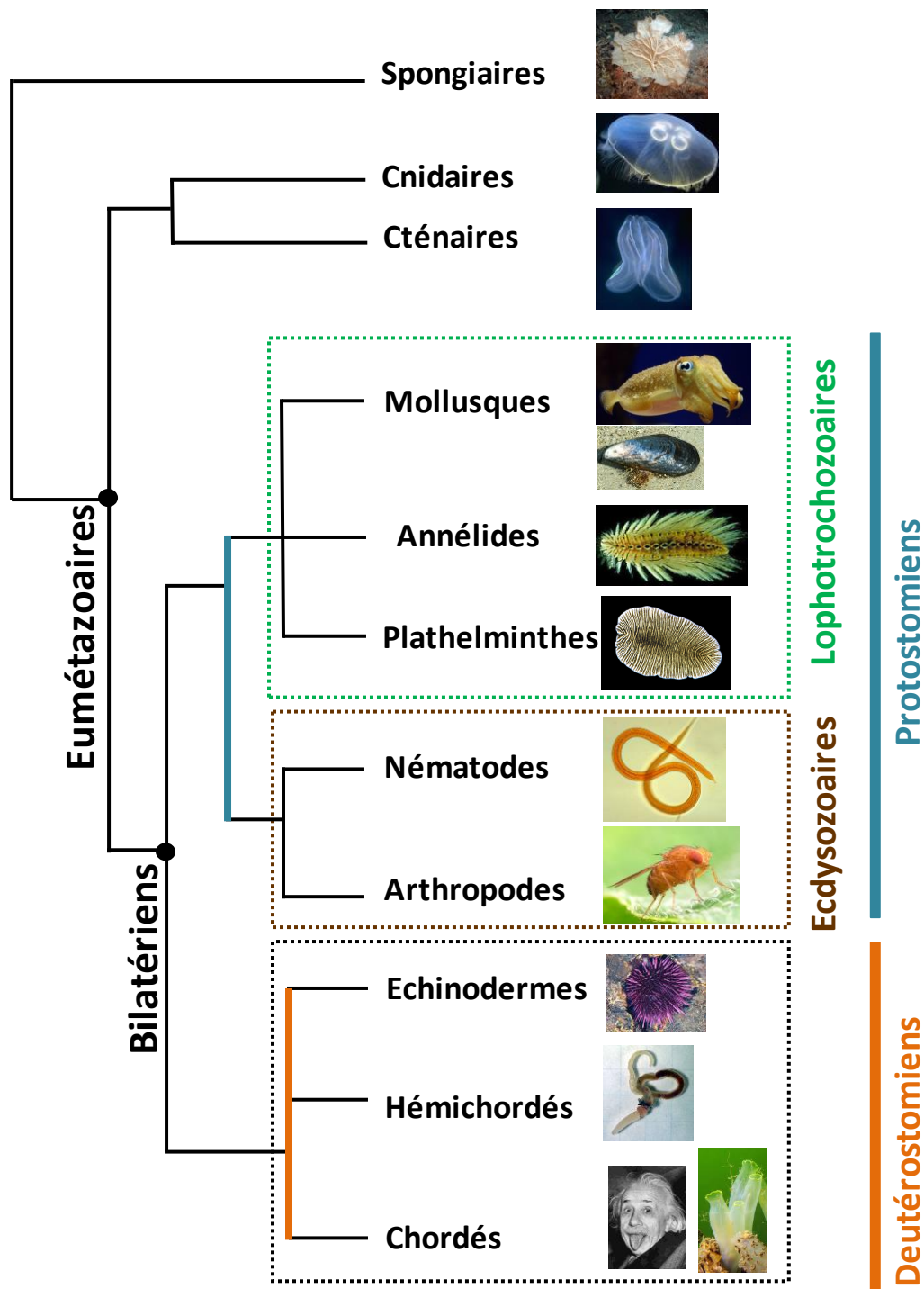


Figure 2 : Arbre phylogénétique très simplifié et non exhaustif des métazoaires.

Photos non libres de droit : cténaire : © Greg and Marybeth Dimijian ; annélide : © 1999 Greg W. Rouse ; plathelminthe et hémichordé : © Marine Biological Laboratory, Woods Hole ; Arthropode : © 2005 Alex Wild ; Echinoderme : © 1997 Katja Schulz.

Le cerveau est bien défini chez les vertébrés. Il se construit à partir de l'extrémité rostrale du tube neural, et se compose des vésicules diencéphalique et télencéphalique, toutes deux dérivées du prosencéphale (Morère et Pujol, 2003). Souvent, le cerveau se réfère à l'encéphale entier, et se divise en trois parties : le cerveau antérieur (du prosencéphale), moyen (du mésencéphale) et postérieur (du rhombencéphale à l'origine du métencéphale et myelencéphale) (Lumsden & Krumlauf, 1996).

Richert et al. (2010) proposent une « neurophylogénie » des non-vertébrés, regroupant les termes et les définitions en un glossaire neuroanatomique. Pour ces auteurs, « le cerveau est un groupement de neurones. C'est une partie du système nerveux. Il constitue la plus importante concentration de neurones antérieurs et peut inclure des types cellulaires supplémentaires telles que les cellules gliales et les cellules pigmentaires ».

D'après cette définition très succincte et très générale, le cerveau ne peut être considéré qu'en présence d'un axe antéro-postérieur. Ainsi le terme de cerveau n'est généralement pas utilisé chez les cnidaires, ni chez les échinodermes, malgré des concentrations de neurones dans certaines régions. Chez les phoronidiens, les brachiopodes et chez les entéropeustes notamment, le cerveau n'est plus présent après la métamorphose (Nielsen, 2005).

Richter et al. (2010) proposent également une terminologie des différents types de cerveau des non-vertébrés :

- Cerveau cycloneurialien qui caractérise un mode d'organisation où un neuropile d'épaisseur uniforme entoure la portion antérieure du système intestinal (forme comme un grand cercle composé d'un grand ganglion), notamment présent chez les nématodes ;
- Cerveau commissural, structure symétrique restreinte au côté dorsal, composée de fibres commissurales (groupements d'axones et d'interneurones) associées à quelques corps cellulaires, présent chez les plathelminthes ;
- Cerveau composé, formé par la fusion de territoires embryonnaires gangliogéniques séparés (arthropodes, annélides). Chez les annélides, le cerveau se développe à partir de l'épispère de la larve, tandis que les ganglions de la partie troncale proviennent de l'hyposphère. Le cerveau adulte est lié aux autres ganglions *via* des connectifs circumœsophagiens. De la même manière, le cerveau des mollusques se développe à partir de l'épispère de la larve (ganglions cérébraux) tandis que les ganglions postérieurs (ganglions pleuraux, pédieux, palléoviscéraux) proviennent de l'hyposphère. On ne peut parler de segments du tronc de par l'absence de segmentation

chez les mollusques. D'après cette définition, le cerveau est situé dorsalement par rapport au système intestinal (dérive des ganglions cérébraux). Chez les céphalopodes, le cerveau exhibe un haut niveau de concentration neurale unique chez les non-vertébrés où les ganglions cérébraux et les ganglions pédieux et viscéraux postérieurs forment ensemble un cerveau cohésif et hiérarchisé. La logique tendrait alors à considérer l'ensemble de ces ganglions centraux (même ceux situés ventralement par rapport au système intestinal) comme faisant partie du cerveau, en tant qu'unicité fonctionnelle. C'est d'ailleurs la terminologie communément adoptée chez ce groupe de lophotrochozoaires ; le cerveau ne se limite pas aux seuls ganglions cérébraux.

L'appellation de cerveau est donc associée à une grande variété de structures différentes, et les définitions dépendent souvent du modèle d'étude. Aussi, un cerveau se définit en fait plus souvent par ses aspects fonctionnels : fonction d'intégration (des afférences sensorielles, des paramètres internes, de l'état physiologique...), de contrôle et de coordination (activité des muscles, aspects des fonctions végétatives, maintien de l'homéostasie...), des fonctions cognitives (association, mémoire...). L'emploi d'une terminologie unique pour décrire les systèmes nerveux centralisés et les cerveaux dans les différentes familles de métazoaires ne sous-entend pas forcément que ces structures sont homologues, et cette question d'homologie se pose d'autant plus avec l'émergence de nouveaux modèles d'étude phylogénétiquement éloignés. Si les types cellulaires spécifiques du SN (cellules nerveuses) sont vraisemblablement hérités d'un ancêtre commun aux eumétazoaires (Arendt, 2008), l'origine de la centralisation du SN chez l'ancêtre des bilatériens *Urbilateria* reste à élucider.

La réponse à la question de l'origine de la centralisation du système nerveux ne peut donc pas être apportée au travers d'études comparatives morphologiques seules. Une analyse comparée des mécanismes moléculaires régissant la mise en place des systèmes nerveux peut aider à discriminer les homologies des convergences.

2- La centralisation du SN, quelles hypothèses évolutives ?

L'analyse comparée de l'organisation et des mécanismes de mise en place du système nerveux est essentiellement menée chez les vertébrés (souris) et les ecdysozoaires (drosophile), et plus récemment chez les lophotrochozoaires avec l'émergence du modèle annélide *Platynereis dumerilii*.

Deux hypothèses majeures sur l'origine de la centralisation du système nerveux sont avancées :

- L'hypothèse monophylétique, selon laquelle l'ancêtre commun Urbilateria possédait déjà un système nerveux centralisé ;
- L'hypothèse polyphylétique, qui soutient que le système nerveux d'Urbilateria était diffus et que la centralisation serait survenue indépendamment au cours de l'évolution chez les protostomiens et chez les deutérostomiens.

Inspiré par Geoffroy Saint-Hilaire (1822), Anton Dohrn (1875) proposa que le SN des chordés est homologue à celui des annélides et arthropodes. L'ancêtre Urbilateria aurait présenté une organisation de type annélide, et aurait subi au cours de l'évolution une inversion de l'axe D/V de son système nerveux qui se serait retrouvé en position dorsale chez l'ancêtre des deutérostomiens. Cette théorie de l'inversion de l'axe nerveux est renforcée depuis la découverte que les mécanismes moléculaires régulateurs du développement du SN sont homologues chez les annélides, insectes et vertébrés (Arendt & Nubler-Jung, 1994 ; De Robertis & Sasai, 1996 ; Holland & Takahashi, 2005). En effet, malgré leurs différences, les organisations des espèces modèles dépendent d'une série de gènes homologues présentant des profils d'expressions similaires le long des axes antéro-postérieur et médio-latéral du SN et mettant en jeu des voies de signalisation comparables. La répartition longitudinale des gènes de spécification neurale, régissant le pattern médio-latéral du SN, est notamment quasiment similaire dans les ébauches des chaînes ganglionnaires ventrales de *P. dumerilii*, de *D. melanogaster* et dans l'ébauche neurale dorsale de *M. musculus* (Denes et al., 2007).

Les différences d'organisations ont longtemps soutenu l'hypothèse polyphylétique stipulant que le SN des deutérostomiens aurait évolué indépendamment de celui des arthropodes et annélides (Garstang, 1894 ; Romer, 1972). En effet, une disposition dorsale du SNC est généralement associée aux deutérostomiens. Chez les ecdysozoaires et chez les annélides, le

SNC est divisé en un cerveau, toujours situé en région céphalique, suivi d'une chaîne ganglionnaire ventrale. La disposition ventrale des cordons nerveux est de ce fait généralement associée aux protostomiens. Des études menées chez l'hémichordé *Saccoglossus kowalevskii* sur plus de 20 gènes ont révélé une distribution antéro-postérieure équivalente à celle des homologues impliqués dans la mise en place de cet axe chez les vertébrés et des insectes (Lowe et al., 2003). Ce résultat conforte l'hypothèse selon laquelle le rôle de ces gènes dans le contrôle du développement antéro-postérieur du SN est antérieur à la divergence insectes-vertébrés. Cependant la distribution des gènes de régionalisation médio-latérale est surprenante. En effet, l'expression de ces gènes n'est pas concentrée dans la chorde dorsale ou dans la chorde ventrale de *Saccoglossus*, mais se répartit dans le tissu épidermique tout autour de l'animal. Le système nerveux des hémichordés diffus laisse entendre que l'ensemble de l'ectoderme peut donner naissance à des cellules neurales (Lowe et al., 2003 ; Schubert et al., 2004 ; Lowe et al., 2006). Ainsi, ce résultat tend davantage à soutenir l'hypothèse polyphylétique : la centralisation du SN a pu se produire indépendamment au cours de l'évolution chez les protostomiens et deutérostomiens respectivement à partir d'un ancêtre possédant un système nerveux diffus (Lowe et al., 2003 ; Holland, 2003 ; Schubert et al., 2004 ; Meinhardt, 2004).

Les partisans en faveur de l'hypothèse de polyphylie mettent également en avant les différences des processus de la neurogenèse entre les différentes espèces (Partie I Chapitre 3) (Moroz, 2009). De plus, des différences de profils d'expression des gènes de spécification neurale peuvent être mises en évidence en dehors des taxons des arthropodes, des chordés et des annélides. Ainsi, se cantonner à l'étude de ces organismes ne nous apporte pas nécessairement tous les éléments nécessaires à la compréhension de l'évolution de l'organisation du système nerveux chez les eumétazoaires. En étudiant des organismes présentant de fortes similitudes d'organisation (métamérie, axes nerveux délimités au sein de chaîne ou de cordon nerveux...), il peut s'avérer complexe voire souvent impossible de faire la part entre ce qui a été hérité d'un ancêtre commun et ce qui est le fruit d'une convergence évolutive. En effet, les profils d'expression similaires peuvent refléter un recrutement des mêmes cascades moléculaires régulatrices par convergence évolutive, illustrant plus une homologie de réseaux moléculaires qu'une homologie des systèmes nerveux eux-mêmes (Wagner, 2007). Des profils d'expressions géniques similaires ne permettent pas toujours à eux seuls d'établir les liens d'homologies d'organes (Harris et al., 2002).

Nous constatons que les études menées sur les 3 modèles que sont la souris, la drosophile et les annélides, et la proximité des patterns moléculaires conduisent à considérer comme plus probable l'hypothèse monophylétique. Néanmoins, toutes les grandes familles n'ont pas encore été étudiées de façon aussi extensive, alors que les profils d'expressions géniques issus d'autres espèces tendent à supporter l'hypothèse polyphylétique. L'étude des mollusques, qui possèdent un système nerveux centralisé et qui présentent une organisation non métamérisée, peut permettre de tester ces hypothèses.

II Intérêts des mollusques en Evo-Dévo du système nerveux

Les mollusques ont permis des avancées extrêmement importantes dans la compréhension du fonctionnement du système nerveux. En 1936, J.Z Young introduisait l'axone géant de calmar dans les études d'axonologie. Vingt fois plus gros que les axones d'*Homo sapiens*, il permit notamment de comprendre le mécanisme de potentiel d'action (Hodgkin et Huxley reçurent le prix Nobel pour cette découverte en 1963) et de la transmission synaptique (Llinas, 1999). Les études menées sur l'Aplysie par Eric Kandel (1973-1978) ont permis la mise en évidence de la plasticité synaptique. C'est donc à partir des organismes mollusques que se sont développées les connaissances de base de la neurobiologie. Depuis quelques années les études génomiques sur les mollusques se multiplient, notamment sur des modèles d'importance économique (huître, ormeau...). Zhang et al. (2012) ont ainsi analysé les caractéristiques génomiques de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. D'autres études ont rendu possibles des applications médicales, notamment à partir de l'analyse de certains gastropodes (Westley et al., 2013) et céphalopodes (Huang et al., 2012).

Les mollusques regroupent plus de 100 000 espèces actuelles et se rencontrent dans tous les écosystèmes terrestres et aquatiques. Leurs synapomorphies sont leur manteau, tégument spécialisé qui sécrète une coquille dans la plupart des groupes, une radula qui consiste en une structure buccale chitineuse, un pied impliqué essentiellement dans la locomotion et des branchies en forme de peigne (Lecointre & Le Guyader, 2006), mais également un stade de larve véligère faisant généralement suite à la phase de larve trochophore spécifique des lophotrochozoaires. Ce groupe majeur de Lophotrochozoaires présente une grande diversité de formes et de modes de vies. Certains mollusques présentent une métamérie apparente comme le chiton polyplacophore, mais des études tendent à mettre en évidence un mode de développement qui ne suit pas de schéma segmenté (Friedrich et al., 2002). La plupart des mollusques ne sont clairement pas métamérisés (gastropodes, céphalopodes). Si la majorité des eumollusques possèdent une coquille externe, chez les céphalopodes actuels à l'exception du Nautilé, la coquille est interne voire absente, ce qui modifie drastiquement la fonction du manteau qui n'est dorénavant plus protégé. Une autre différence notable dans le plan d'organisation des céphalopodes est qu'ils ne possèdent plus de pied locomoteur, mais des appendices péribuccaux (bras et tentacules). Les similitudes morphologiques entre gastropodes et céphalopodes, notamment au niveau de leur système nerveux (céphalisation claire,

cérébralisation plus importante) sont généralement considérées comme étant homologues, ce qui a conduit à rassembler ces deux groupes au sein du taxon des Viscéroconques (Lecointre & Le Guyader, 2006). En 2002, une étude moléculaire soutenait davantage un rassemblement céphalopodes-scaphopodes (Steiner & Dreyer, 2002). Des études moléculaires récentes viennent cependant de démontrer que les gastropodes, bivalves et scaphopodes feraient partie d'un même taxon, tandis que les céphalopodes seraient davantage apparentés aux monoplacophores dans un taxon voisin (Kocot et al., 2011, Smith et al., 2011 ; Kröger et al., 2011). Un exemple de phylogénie est présenté ci-dessous (**Fig. 3**). Ces données forcent à reconsidérer les hypothèses d'homologies et de convergences de céphalisation et de cérébralisation chez les mollusques.

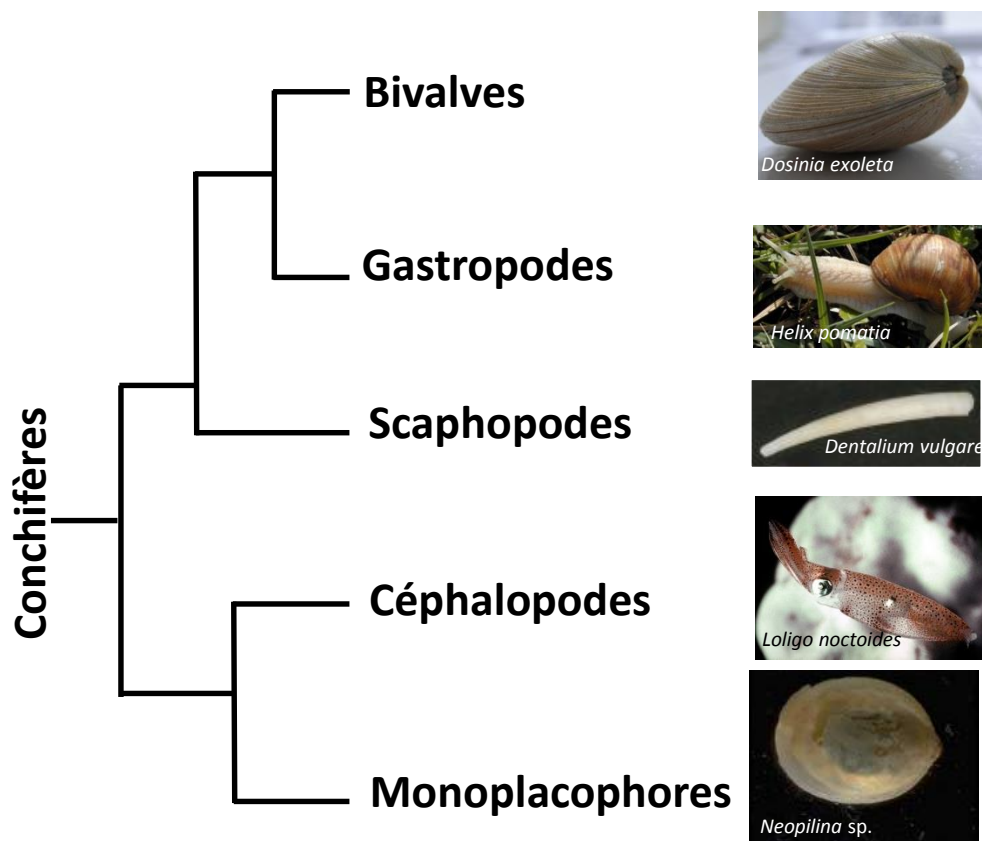


Figure 3 : Arbre phylogénétique simplifié des mollusques conchifères. Dans cette représentation les céphalopodes sont phylogénétiquement proches des monoplacophores, mais d'autres scénarios existent. D'après Kocot et al., 2011, Smith et al., 2011 ; Kröger et al., 2011.

Le système nerveux de tous les mollusques présente une architecture typique : des paires de ganglions (cérébraux, buccaux, pédieux, pleuraux, pariétaux et viscéraux) reliés entre eux par des commissures, et les uns aux autres par des connectifs. Le système nerveux ne s'organise pas le long d'une chaîne ganglionnaire axiale comme chez les insectes et annélides. **L'absence de système axial médian nerveux rend l'orientation difficile à appréhender dans ces organismes aux plans d'organisations complexes.** Trois paires de ganglions centraux situés de part et d'autre de l'œsophage forment les deux « triangles » typiques du SN des mollusques, et ces triangles subsistent chez les bivalves et les autres mollusques ne disposant pas de « tête » à proprement parler. Peu d'études ont porté sur la description des étapes de la neurogenèse chez les mollusques. Les ganglions se forment par l'accumulation de neuroblastes issus de placodes ectodermiques dispersées sur l'embryon (Moor, 1983 ; Jacob, 1984), ce qui constitue une autre différence majeure avec les espèces communément étudiées. Les ganglions cérébraux supra-œsophagiens sont issus de l'épispère de la larve trochophore (Hinman et al., 2003), les ganglions sous-œsophagiens plus postérieurs sont issus de l'hypospère (Partie I Chapitre 1). Les commissures et connectifs se forment secondairement à partir des ganglions (Raven, 1966). Par la suite, seuls certains de ces ganglions vont se regrouper au cours du développement pour former un éventuel cerveau, en général composé des ganglions cérébraux, pédieux et pleuraux ou viscéraux (**Fig. 4**). De récentes études démontrent que le système nerveux larvaire qui précède la mise en place du système nerveux adulte en formation est fortement remanié durant la métamorphose. Il est constitué en particulier d'un organe apical sensoriel (ASO), qui dégénère au moment de la métamorphose (Lin & Leise, 1996 ; Dickinson & Croll, 2003 ; Hinman et al., 2003). Chez les céphalopodes néanmoins, les ganglions centraux s'agglomèrent au cours d'un développement direct sans stade larvaire, jusqu'à fusionner formant alors une unité cérébrale composée de masses sous-divisées en multiples lobes fonctionnellement hiérarchisés (Boycott, 1961) (**Fig. 4**). **Cette spécification fonctionnelle est unique chez les mollusques et convergente avec le cerveau des vertébrés, ce qui pose la question des mécanismes à la base de l'émergence de telles spécificités et des similitudes moléculaires de développement avec les autres mollusques.** Le mode de développement téloécithe des céphalopodes présente une segmentation partielle et discoïdale, contrairement aux autres mollusques pour qui la segmentation est spirale. Les céphalopodes constituent de ce fait des organismes modèles idéaux en Evo-Devo (Articles n°4 et n°5) et notamment extrêmement intéressants dans les études de développement du SN.

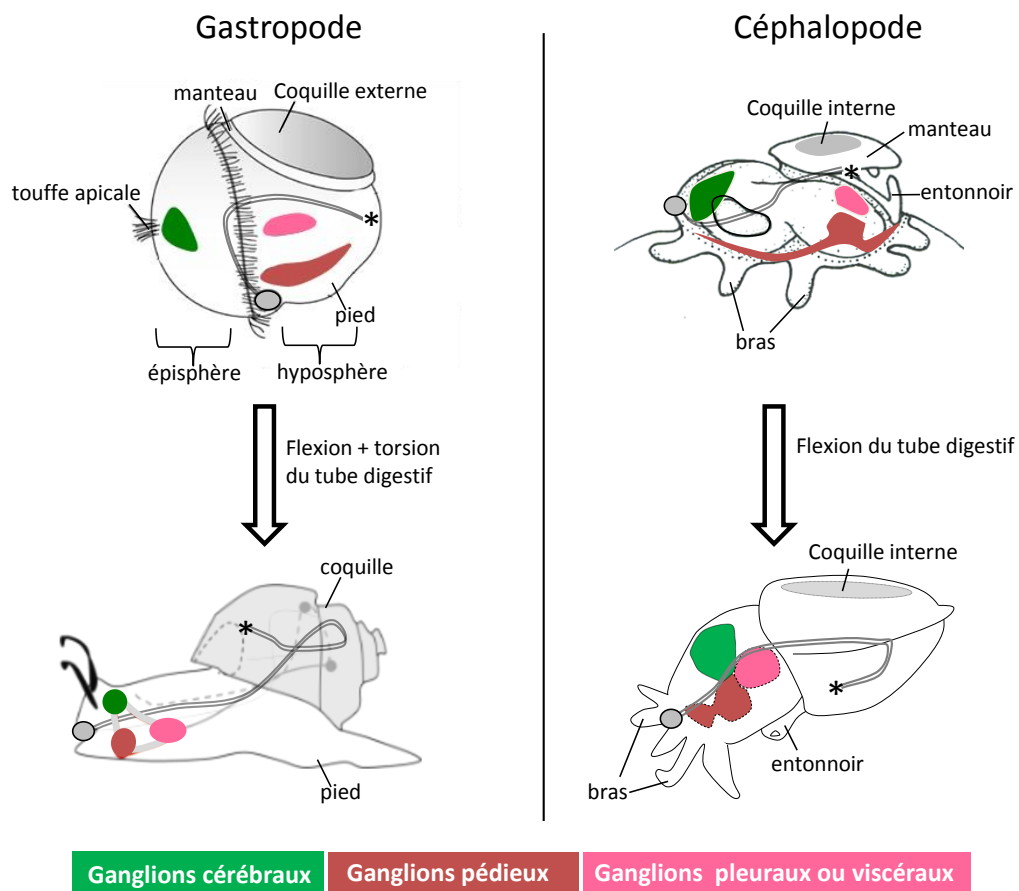


Figure 4 : Schéma comparatif de la disposition des ganglions composant le cerveau chez un gastropode et un céphalopode (*S. officinalis*). En haut : stade larvaire ou embryonnaire. En bas : juvénile ou adulte. L'œsophage est illustré par un double trait gris, la bouche par un rond gris et l'anus par un astérisque noir. Les ganglions cérébraux se disposent au-dessus de l'œsophage, et sont issus de l'épispère de la larve dans le cas d'un développement indirect. Les ganglions pédieux et pleuraux ou palléoviscéraux sont disposés sous l'œsophage et sont issus de l'hyosphère de la larve. Chez *S. officinalis*, les ganglions s'agglomèrent et fusionnent formant un cerveau cohésif. La flexion et la torsion éventuelle du tube digestif modifient les axes de symétrie.

CHAPITRE 2 :

PRESENTATION DU MODELE *SEPIA OFFICINALIS*

I Classification phylogénétique

Les céphalopodes sont des bilatériens, protostomiens, lophotrochozoaires et regroupent plus de 700 espèces actuelles, allant du centimètre pour l'octopode pygmée *O. joubini* à plusieurs mètres pour le calmar géant. Les céphalopodes sont des organismes exclusivement marins divisés en deux groupes : les nautiloïdes et les coléoïdes. Les seuls représentants actuels des nautiloïdes sont les Nautilus. Les coléoïdes comprennent les Octobranchia à 8 bras et les Decabrachia qui possèdent 10 bras dont deux tentacules. Parmi les Octobranchia, on distingue les Octopoda (ex. pieuvres). La seiche est un Coléoïde Décabrachia, tout comme le poulpe et le calmar, et fait partie du groupe des Sepiidés (**Fig. 5**).

Parmi les synapomorphies des céphalopodes sont retrouvés (Lecointre & Le Guyader, 2006) :

- Les appendices péribuccaux (bras et tentacules) ;
- Un siphon, ou entonnoir qui assure l'expulsion de l'eau de la cavité palléale ;
- Un système circulatoire clos contrairement aux autres mollusques ;
- Une poche à encre ;
- Le bec de perroquet, pièces squelettiques mandibulaires.

Les céphalopodes présentent également un SN extrêmement condensé, avec un cerveau fonctionnellement hiérarchisé protégé par une capsule cartilagineuse, et des ganglions spécifiques tels que les ganglions stellaires.

Bien que faisant partie du groupe des mollusques lophotrochozoaires, les céphalopodes ne présentent pas de phase larvaire véligère ou trochophore au cours de leur développement. Ces spécificités seront discutées plus en détail dans les paragraphes qui suivent.

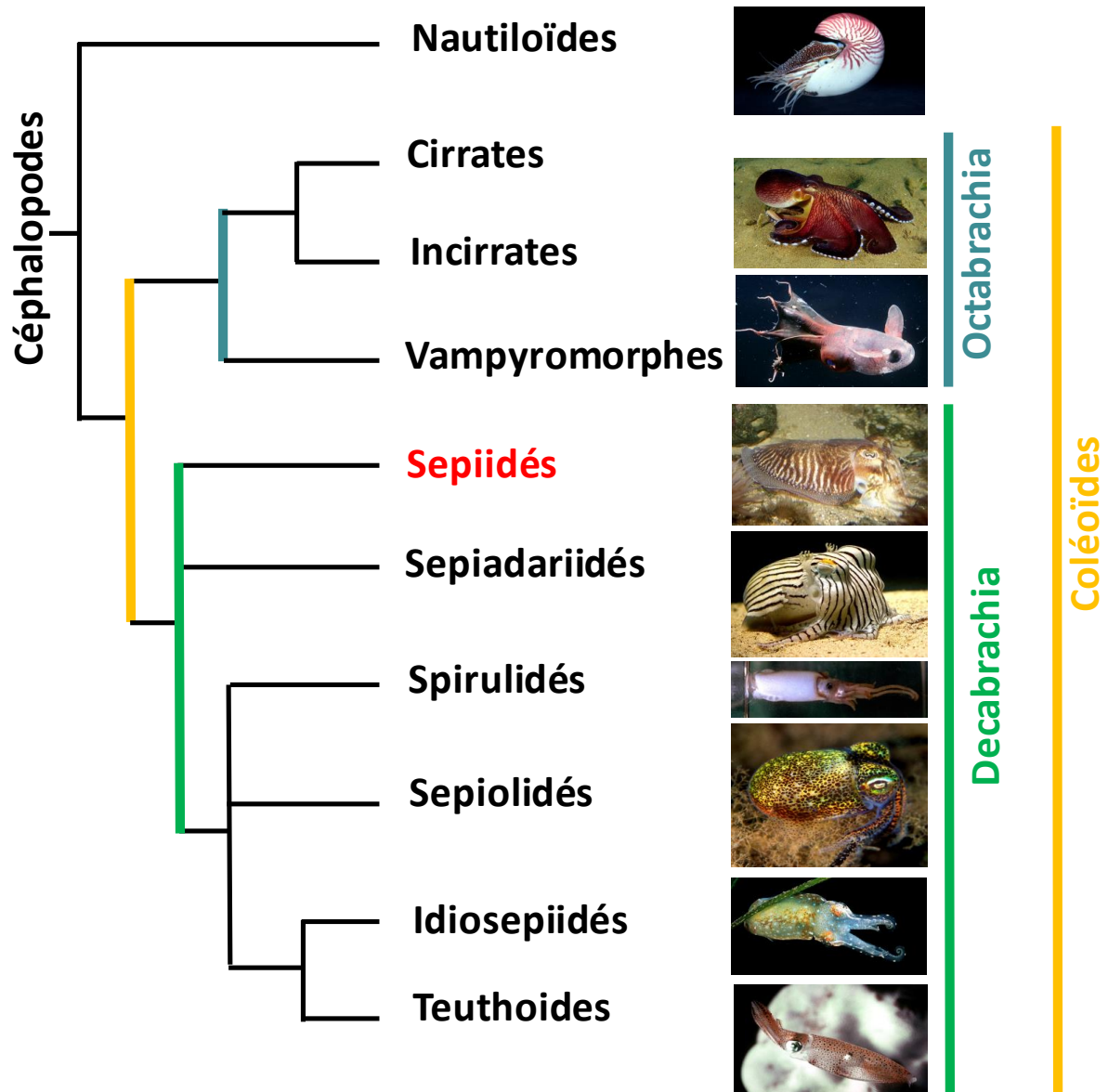


Figure 5 : Une possibilité d'arbre phylogénétique simplifié des céphalopodes. En rouge, le groupe des Sepioidés dont fait partie la seiche. Photos non libres de droits : © 1999 Brad Seibel ; © 2004 Mark Norman. D'après Lindgren et al., 2004 ; Bonnaud et al., 1997.

II Anatomie générale

La morphologie générale des coléoïdes adultes a conduit à l'utilisation courante des termes de céphalopodium et de viscéropallium, qui distinguent globalement le territoire céphalique du territoire viscéral (**Fig. 6**).

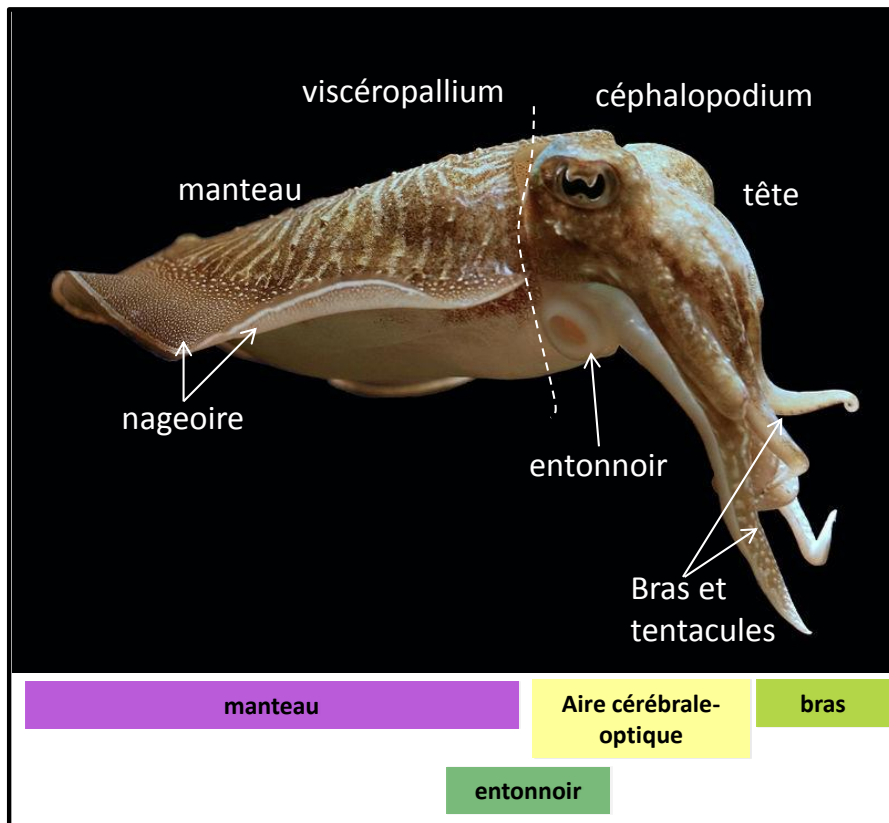


Figure 6 : Organisation anatomique générale de *S. officinalis*. La ligne pointillée marque la délimitation des viscéropallium et céphalopodium. Les codes couleurs seront repris durant le paragraphe IV sur le développement.

Céphalopodium

Le céphalopodium désigne globalement :

- La région cérébrale-optique, dans laquelle se situent :
 - le cerveau, protégé par une capsule cartilagineuse ;
 - les yeux situés de part et d'autre de la tête ;

- le bulbe buccal qui entoure la radula et le « bec de perroquet », mâchoires chitineuses ;
- Les bras et tentacules, pourvus de ventouses, sont organisés en une couronne brachiale autour de la bouche. L'hypothèse actuelle est que les bras sont des structures dérivées du pied ancestral des mollusques (Naef, 1928 ; Bandel & Boletzky, 1988). Les ventouses constituent des structures sensorielles, qui participent à la prise alimentaire. Les tentacules sont impliqués dans la capture des proies. Chez certaines espèces les bras sont plus largement impliqués dans la locomotion, en particulier chez les octopodes dont le mode de déplacement par reptation est adapté au mode de vie benthique ;
- L'entonnoir. Ce dernier comprend deux parties : le tube de l'entonnoir et la poche de l'entonnoir, située dans la région nucale et rattachée au tube. Le tube de l'entonnoir est flexible, et sa position détermine la direction de l'eau éjectée de la cavité palléale et donc la direction de la propulsion de l'animal. La partie postérieure du pied des mollusques serait peut être également à l'origine du tube de l'entonnoir, mais ce point reste largement débattu (Bandel & Boletzky, 1988 ; Boletzky, 1989 ; Shigeno et al., 2008).

Viscéropallium

Le viscéropallium comprend :

- Le manteau, contenant la masse viscérale, les gonades, les branchies sont dans la cavité palléale. Dans le manteau se situent également les ganglions stellaires ;
- La coquille, internalisée. La coquille de la seiche (communément appelée « os de seiche ») est une structure aragonitique constituée de loges dans lesquelles des variations de composition relative en liquide et gaz facilitent la flottabilité.

Le manteau est particulièrement impliqué dans la fonction de locomotion chez les coléoïdes. Les contractions du manteau et de l'entonnoir provoquent l'expulsion de l'eau *via* l'entonnoir (l'ensemble formant l'hydrostat) et permettent une nage rapide et active par propulsion. L'entonnoir est généralement associé au céphalopodium, bien qu'il forme une unité fonctionnelle avec le manteau (Mangold et al., 1989). Des nageoires raccordées latéralement au manteau permettent la stabilisation et une nage lente.

III Habitat et cycle de vie

S. officinalis se distribue sur la côte est Atlantique, en mer Baltique, en mer du Nord, en mer Méditerranée, et en Manche. Les plus grands spécimens mesurent jusqu'à 50 cm sans les tentacules (longueur du manteau), mais les tailles varient en fonction des populations et des aires géographiques. *S. officinalis* vit dans les eaux côtières et sur le plateau continental à des profondeurs pouvant aller jusqu'à 200 mètres, avec une plus forte abondance aux alentours de 100 mètres (Royer, 2002 ; Guerra, 2006). Il s'agit d'une espèce migratrice dont le cycle de vie s'étale sur deux années (Boucaud-Camou & Boismery, 1991) (**Fig. 7**).

Dès l'éclosion (du printemps à l'été) le juvénile est semblable à l'adulte et adopte directement le mode de vie necto-benthique. A l'automne, les juvéniles et les jeunes de l'année précédente quittent les côtes en direction des eaux plus profondes du large (zone hivernale), avant de revenir sur les côtes durant la période estivale. Après le second hiver passé au large, les seiches, qui sont devenues adultes et matures sexuellement, migrent une dernière fois vers les côtes où elles se reproduisent. Chez les céphalopodes, les sexes sont séparés (Richard, 1970). La seiche mâle atteint sa maturité sexuelle dès la fin de la première année, la femelle à 20 mois. L'accouplement se fait « tête à tête ». Le mâle possède un bras ventral gauche modifié, le bras hectocotyle. Celui-ci permet le transfert des spermatophores évacués dans sa cavité palléale par les contractions de son pénis vers la bourse copulatrice de la femelle située sous sa masse buccale (Mangold, 1989). Ce transfert déclenche chez la femelle le transport des ovocytes du coelome génital (dans la cavité palléale) jusqu'à cette poche copulatrice en passant par l'entonnoir. Les ovocytes sont initialement entourés d'un chorion transparent formé par les cellules folliculaires. Le chorion va être entouré d'une couche gélatineuse sécrétée par la glande de l'oviducte et encapsulé par d'autres couches sécrétées par les glandes nidamentaires et poche du noir dans la cavité palléale. Cette capsule multicouche contient entre autre de la mélanine, d'où l'aspect noir des œufs, mais également des bactéries qui joueraient un rôle antimicrobien (ex. calmar, Pichon et al., 2005). Si la structure capsulaire est de consistance molle au moment de la ponte, ce qui permet notamment la fécondation par les spermatozoïdes au niveau de la poche copulatrice, les polysaccharides qui la composent se polymérisent au contact de l'eau de mer et la capsule, composée de nombreuses enveloppes, se durcit, assurant alors la protection de l'œuf durant tout le développement embryonnaire. La fécondation est donc interne, et la ponte peut être différée de plusieurs mois après la copulation. Les seiches communes pondent des grappes de 500 à 2000 œufs par femelle, de 8 à 9 mm de diamètre, dans des zones peu profondes sujettes aux marées. Ces œufs, également qualifiés de « raisins de mer », sont

accrochés un par un à un substrat (algues, rochers, paniers de pêcheurs...). Chaque œuf contient un embryon. En fonction de la température de l'eau, le développement dure en moyenne 2 à 3 mois en Manche, parfois 1 mois en Méditerranée. Après la ponte, les seiches adultes meurent par cohorte, ce qui explique l'échouage massif d'os de seiche sur les plages à certaines périodes de l'année.

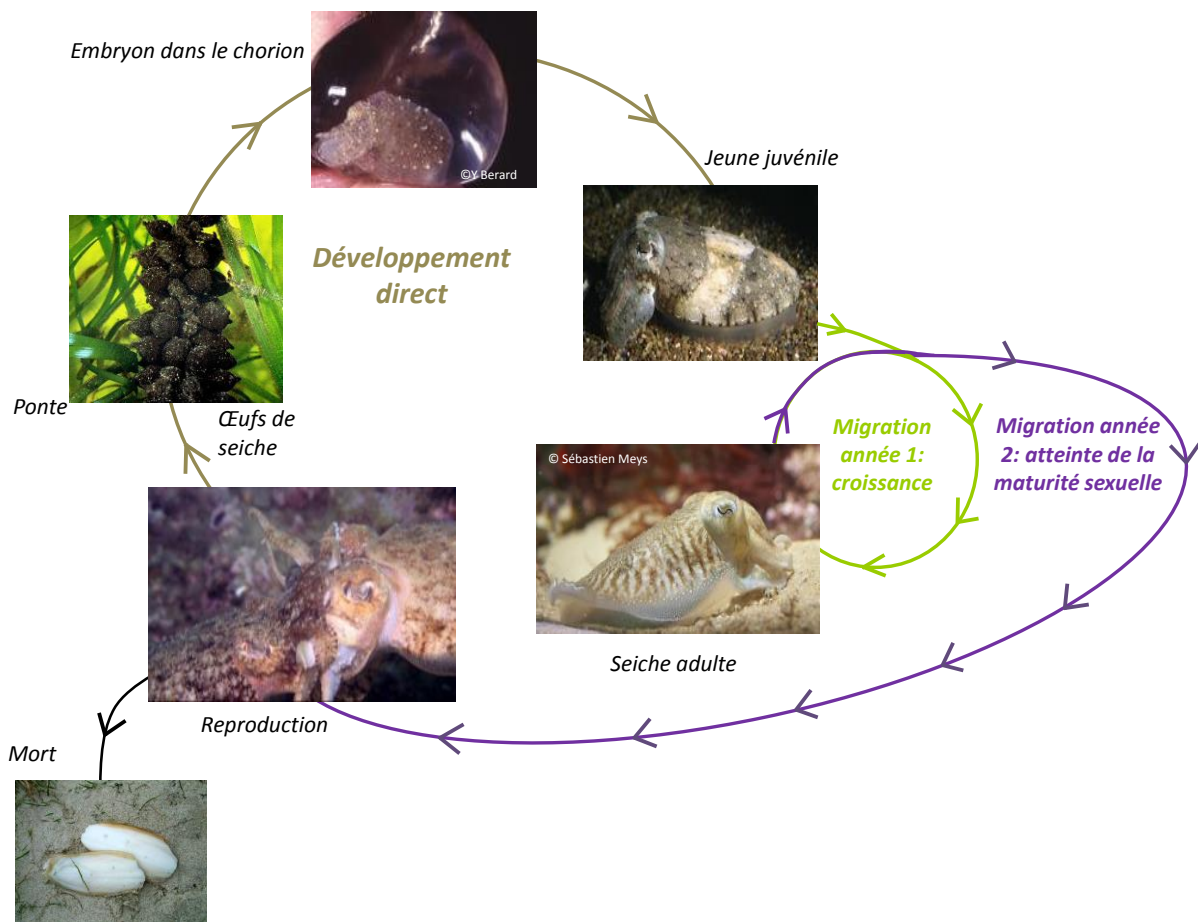


Figure 7 : Cycle de vie de *S. officinalis*. Après la reproduction, des œufs sont pondus en grappes. Dans chaque œuf, un embryon va se développer (développement direct) (en brun). A l'éclosion, le juvénile adopte directement le mode de vie necto-benthique de l'adulte. A l'automne, les jeunes entament une migration au large, c'est une phase de croissance avant de revenir en été sur les côtes (en vert). L'année suivante, les seiches font une dernière migration avant de revenir se reproduire sur les côtes (en violet), puis meurent (en noir).

IV Développement embryonnaire

Mon travail de thèse s'appuie exclusivement sur les stades embryonnaires de *S. officinalis*, donc sur la partie du cycle qui se déroule dans l'œuf. L'absence de métamorphose permet un suivi de la croissance et du devenir des structures embryonnaires. Les œufs sont très riches en vitellus (œufs télolécithes), et comme souvent dans ce cas de figure le suivi des lignées cellulaires est plus complexe à étudier. L'aspect morphologique des étapes du développement a été bien décrit par Naef (1928), Lemaire (1970) et Boletzky (1988). Au sein du laboratoire nous utilisons la table d'estimation et de numérotation des stades embryonnaires définie par Lemaire. Celui-ci a établi 30 stades de développement embryonnaire, dans les conditions de captivité les œufs de *S. officinalis* progressent alors d'environ un stade par jour d'après cette nomenclature.

Les stades 1 à 10 correspondent à la phase de segmentation (**Fig. 8**). L'œuf étant très riche en vitellus (télolécithe), la segmentation est inégale et discoïdale (type méroblastique). Les pronucléi mâle et femelle fusionnent près du centre du disque de plasma formatif, situé sous le micropyle du chorion au niveau du pôle animal de l'œuf (Boletzky, 1989). Au départ l'aire de segmentation consiste en un syncytium formatif dont seule la surface est segmentée. Par la suite ce syncytium formatif se transforme en un blastoderme unistratifié constitué de blastomères reposant sur la couche plasmatique qui entoure le vitellus. A la fin de la segmentation, le blastoderme forme ainsi une plaque au niveau du pôle animal (**Fig. 8 A**). A la périphérie du blastoderme se trouvent les blastocônes appartenant à la couche plasmatique qui entoure le vitellus (**Fig. 8 B**), les noyaux des blastocônes se multiplient alors dans la couche plasmatique formant le syncytium nutritif ou syncytium vitellin.

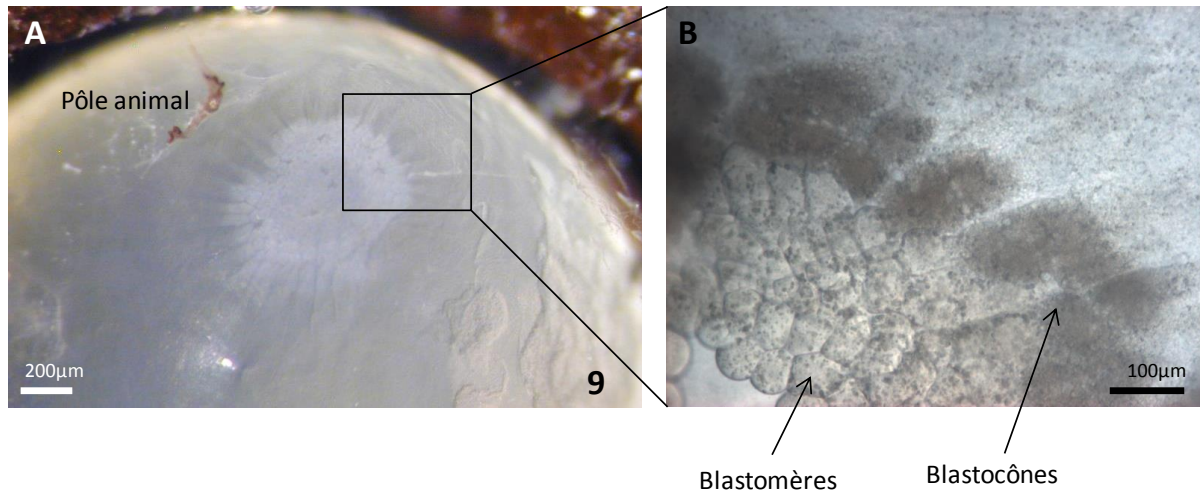


Figure 8 : Œufs télolécithes de *S. officinalis* en cours de segmentation. Le stade est indiqué. Les enveloppes ont été retirées mais pas le chorion transparent qui permet la tenue de l'œuf. L'embryon se développe au pôle animal.

Les stades 10 à 15 correspondent à la phase de gastrulation (**Fig. 9**). Des processus emboliques en périphérie du blastoderme unistratifié vont conduire à la formation d'un anneau périphérique interne pluristratifié qui constitue le mésendoderme (**Fig. 9 A, C**), recouvert par une grande plaque centrale ectodermique qui constitue le feuillet externe (Boletzky, 1989). Trois couches sont ainsi formées entre les stades 10 et 12 : l'ectoderme, le mésendoderme à l'origine du mésoderme et de l'endoderme qui formera l'intestin moyen (ancien anneau périphérique de blastomères) et le syncytium vitellin qui comprend les blastocônes. Ce syncytium est en étroite relation avec le blastoderme, et représenterait en fait la partie transitoire de l'endoderme (Naef, 1928) en constituant un système de nutrition de l'embryon. La formation des feuillets est achevée vers le stade 13. Le feuillet externe ectodermique a alors dépassé l'anneau mésendodermique, et le bord de l'ectoderme va s'ancrer sur le syncytium vitellin. Au terme de la gastrulation, l'embryon est constitué d'un blastodisque circulaire reposant sur une large masse vitelline au niveau du pôle animal (mésendoderme + ectoderme embryonnaire), tandis que le pôle végétatif finira internalisé à la suite d'un processus d'épibolie du syncytium vitellin et de l'ectoderme extra-embryonnaire (**Fig. 9 B, D**). Le syncytium vitellin, l'ectoderme extra-embryonnaire et le vitellus forment le sac vitellin.

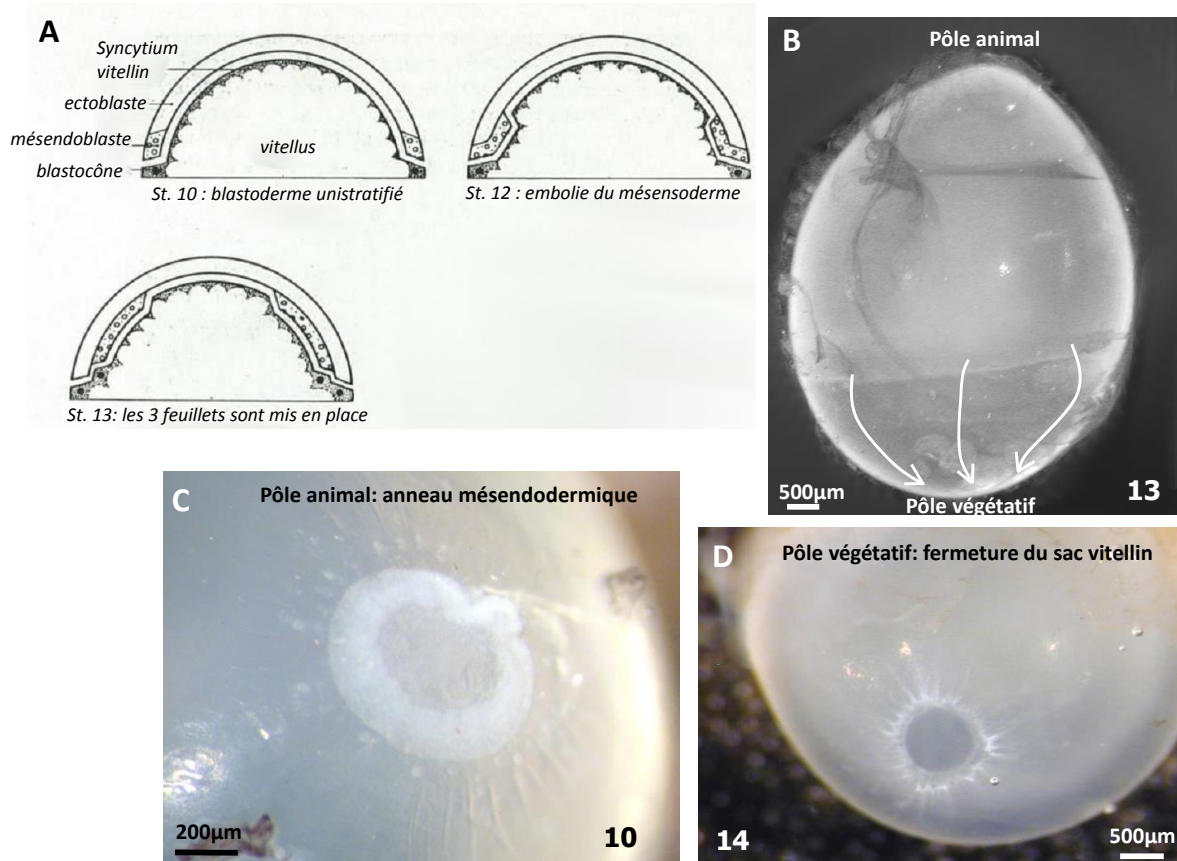


Figure 9 : Œufs télolécithes de *S. officinalis* en cours de gastrulation. Les stades sont indiqués. Les œufs ont été décapsulés et déchorionnés. A, Mise en place des feuillets embryonnaires chez *S. officinalis*. Modifié d'après Boletsky et al., 1989. Le syncytium vitellin et l'ectoderme extra-embryonnaire recouvrent le vitellus par épibolie (flèches blanches B), jusqu'à se refermer au niveau du pôle végétatif (D).

Le type de développement télolécithe rend les expérimentations délicates sur les œufs en particulier lorsque le sac vitellin n'est pas encore constitué. En effet, le chorion qui entoure l'embryon et le vitellus permet la cohésion de l'ensemble et son ouverture provoque un écoulement de la masse vitelline, ce qui déchire les structures embryonnaires. Mon travail de thèse a porté sur les étapes d'organogenèse (stade 15 à l'éclosion), lorsque l'épibolie est achevée. L'organogenèse peut être divisée en trois grandes phases :

- Une phase discoïdale ou plane (phase 1, des stades 15 à 20) (**Fig. 10**). Le pôle animal de l'embryon a la forme d'un disque sur lequel vont se mettre en place les différents territoires embryonnaires, surmontant la masse vitelline. Le manteau se situe au centre du disque et est entouré par les territoires de l'entonnoir. Les territoires présomptifs des yeux se disposent de part et d'autre du disque embryonnaire en périphérie de la bouche (aire cérébrale, comprenant les ganglions cérébraux et aire optique comprenant les ganglions optiques). Enfin la couronne brachiale se situe en périphérie du disque ;

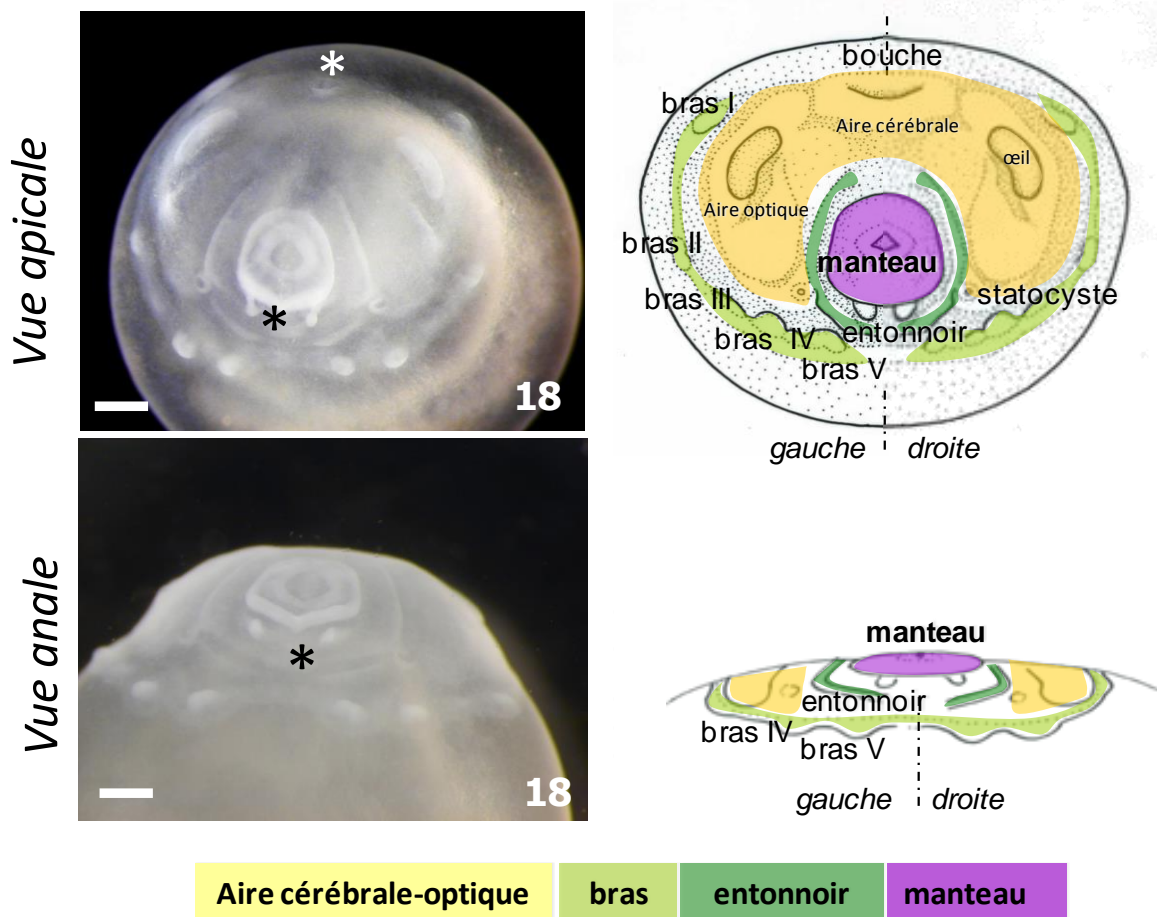


Figure 10 : Embryons de *S. officinalis* en phase plane (stades 15 à 19). A gauche : photos *in toto*, vues apicale et anale. Les emplacements de la bouche et de l'anus sont indiqués (astérisque blanc et noir respectivement). A droite, les schémas indiquent les différents territoires. Echelle : 500µm.

- Une phase d'extension (phase 2, des stades 20 à 23) (**Fig. 11**). L'embryon prend du volume : la couronne brachiale se resserre sur la masse vitelline tandis que le manteau s'en éloigne provoquant l'extension de l'embryon. Le tube digestif entame une flexion modifiant alors la polarité antéro-postérieure bouche-anus. Le tissu ectodermique des bras commence à s'étendre vers la tête à partir du stade 22, formant ainsi 2 paires de « piliers » (p1 et p2). Les piliers des bras commencent à recouvrir le tissu céphalique de l'aire cérébrale-optique, que j'appellerai tissu céphalique précoce ;

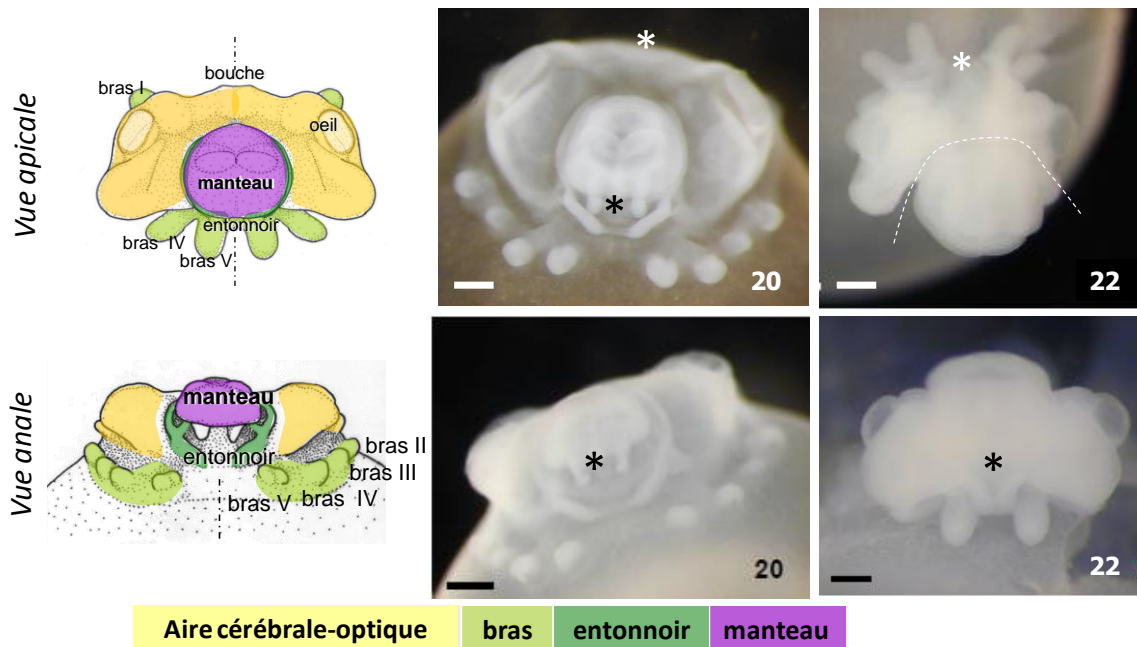


Figure 11 : Embryons de *S. officinalis* en phase d'extension (stades 19 à 22). Vues apicale et anale. Les emplacements de la bouche et de l'anus sont indiqués par un astérisque blanc et noir respectivement. La ligne blanche pointillée au stade 22 marque la future limite céphalopodium/viscéréalium. Echelle : 500µm.

- Une phase de croissance (phase 3, des stades 23 à l'éclosion) (**Fig 12**). L'embryon présente globalement la morphologie du juvénile. L'orientation généralement employée se base sur l'orientation physiologique correspondant à l'orientation de locomotion horizontale : les bras sont antérieurs, le manteau est postérieur, l'entonnoir est en face ventrale. A ces stades nous faisons la distinction entre les céphalopodium et viscéropallium. A la fin de cette phase de croissance, les piliers des bras p1 en face dorsale et p2 en face ventrale recouvrent totalement la tête de l'embryon.

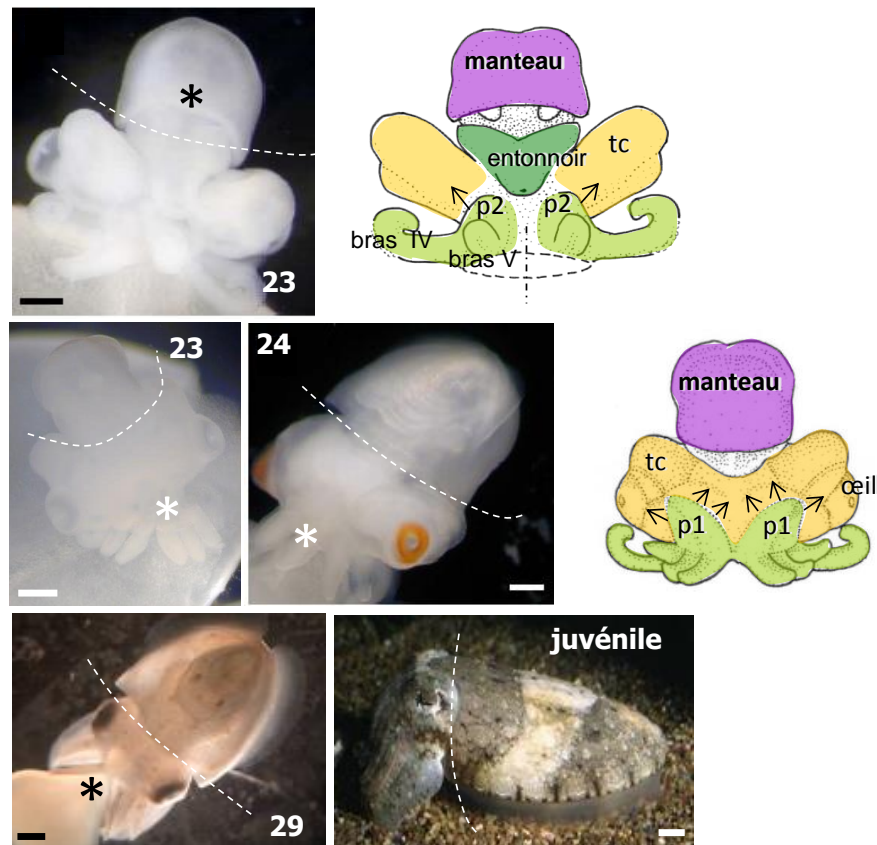


Figure 12 : Embryons de *S. officinalis* en phase de croissance (stades 23 à l'éclosion). Embryons avec indications des emplacements de la bouche et de l'anus (astérisque blanc et noir respectivement). Les lignes blanches pointillées marquent la limite céphalopodium/viscéropallium. Les territoires des piliers des bras (p1 pour piliers 1 coté oral ou dorsal physiologique, p2 pour piliers 2 côté anal ou ventral physiologique) s'étendent au cours du développement et finissent par recouvrir le territoire céphalique précoce (tc pour tissu céphalique précoce). Les flèches noires illustrent ce processus de recouvrement de la tête par les piliers des bras. Code couleurs : voir Fig. 10 et 11. Echelle : 500µm.

Ce type de développement direct sans étape de métamorphose est un caractère spécifique aux céphalopodes parmi les mollusques, et l'émergence d'une telle spécificité s'accompagne de différences développementales majeures. Chez certaines espèces de céphalopodes, le juvénile à l'éclosion présente néanmoins un mode de vie différent de celui de l'adulte. Se basant sur cette observation, le terme de « paralarve » a été proposé par Young & Harman (1988), et se réfère en réalité davantage à des critères écologiques et morphologiques plutôt qu'à un mode de développement. Les termes de paralarve et de juvénile ne sont pas exclusifs. Ainsi, un jeune céphalopode peut être à la fois un juvénile et une paralarve (Sweeney et al., 1992). Dans le cas de *S. officinalis*, le mode de vie du juvénile étant identique à celui de l'adulte, le terme de paralarve n'est pas employé. Chez les autres mollusques non céphalopodes, le développement est parfois qualifié de direct chez certaines espèces de gastropodes car lors de l'éclosion c'est également un juvénile identique à l'adulte qui sort de l'œuf. Cependant, il s'avère que ces organismes semblent présenter un stade larvaire dans l'œuf, ainsi certains auteurs utilisent le terme de développement intracapsulaire (Nasution, 2003). C'est notamment le cas chez la lymnée (ex. *Lymnaea acuminata* Sarker et al., 2007), et chez les gastropodes *Marisa Cornuarietis* (Schirling et al., 2006) (**Fig. 13**) et *Buccinum undatum* (Nasution, 2003).

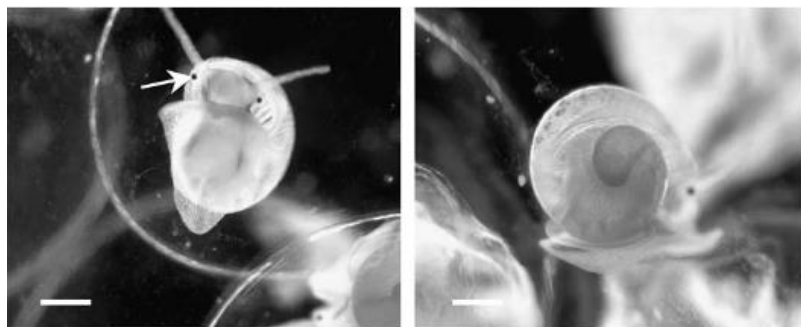


Figure 13 : Développement intracapsulaire du gastropode *Marisa Cornuarietis*. La flèche indique l'œil. Echelle 0.66 mm. (Schirling et al., 2006)

V Orientations et plans d'organisations

L'embryon de seiche (et des céphalopodes en général) passe par de grands bouleversements morphologiques. Seuls les termes droite et gauche de l'animal, qui se définissent par rapport à l'axe de bilatéralité, restent inchangés tout au long de l'enchaînement des différents stades embryonnaires comme chez l'adulte, contrairement aux mollusques chez qui les larves subissent un phénomène de torsion. Cette latéralisation est notamment retrouvée au niveau de l'organisation générale du SN, et se visualise notamment par la capacité de l'animal à présenter des patterns colorés différents de part et d'autre de l'axe de bilatéralité. En revanche, les axes antéro-postérieur et dorso-ventral sont beaucoup plus délicats à appréhender.

La terminologie communément adoptée pour définir l'orientation physiologique adulte s'appuie sur la direction de locomotion horizontale (Hoyle, 1886). Si l'orientation physiologique de la seiche qui définit les bras antérieurs et le manteau postérieur ne variait pas tout au long du développement, cela signifierait qu'au stade discoïdal de l'embryon, l'antérieur correspondrait à la couronne brachiale périphérique, le postérieur au manteau, le dos au côté bouche et le ventre au côté anus. Or l'axe antéro-postérieur se définit généralement par l'axe bouche-anus. Cet axe est modifié au cours du développement des céphalopodes. Par le phénomène de flexion endogastrique, le tube digestif prend la forme d'un « U » durant la phase d'extension, et de ce fait l'axe antéro-postérieur passe de linéaire en phase discoïdale à courbé durant la phase d'extension.

L'orientation physiologique nous permet d'appréhender de manière pratique l'anatomie dérivée des céphalopodes juvéniles et adultes (avec les spécificités des céphalopodium et viscéropallium), mais elle perd son sens au niveau embryologique. Le mode de développement téléolécithe, le phénomène de flexion et la position des bras autour de la bouche sont autant de paramètres qui doivent être pris en compte dans la définition des axes. De plus, tous les céphalopodes n'emploient pas un mode de locomotion horizontale comme la seiche, ainsi l'orientation physiologique peut différer selon les espèces. Les octopodes, par exemple, ont plus souvent tendance à se déplacer « la tête en bas » par reptation sur les fonds avec leur bras : les bras ont donc une position ventrale dans leur cas. Bien que les orientations physiologiques puissent varier, il existe certainement une unicité des mécanismes moléculaires de mise en place des axes chez les céphalopodes. Cette question de l'orientation avait déjà été posée par Naef (1928) qui avait alors comparé un céphalopode « la tête en bas » avec un gastropode (**Fig. 14 A**). Dans cette position, il est en effet plus facile d'appréhender la transformation hypothétique du pied des gastropodes en bras chez les céphalopodes, et la coquille des céphalopodes, réduite,

reste bien positionnée dorsalement. Cette représentation est reprise dans les études Evo-Devo actuelles (Lee et al., 2003 ; Shigeno et al., 2008), illustrant ainsi une position ventrale des bras et dorsale du manteau.

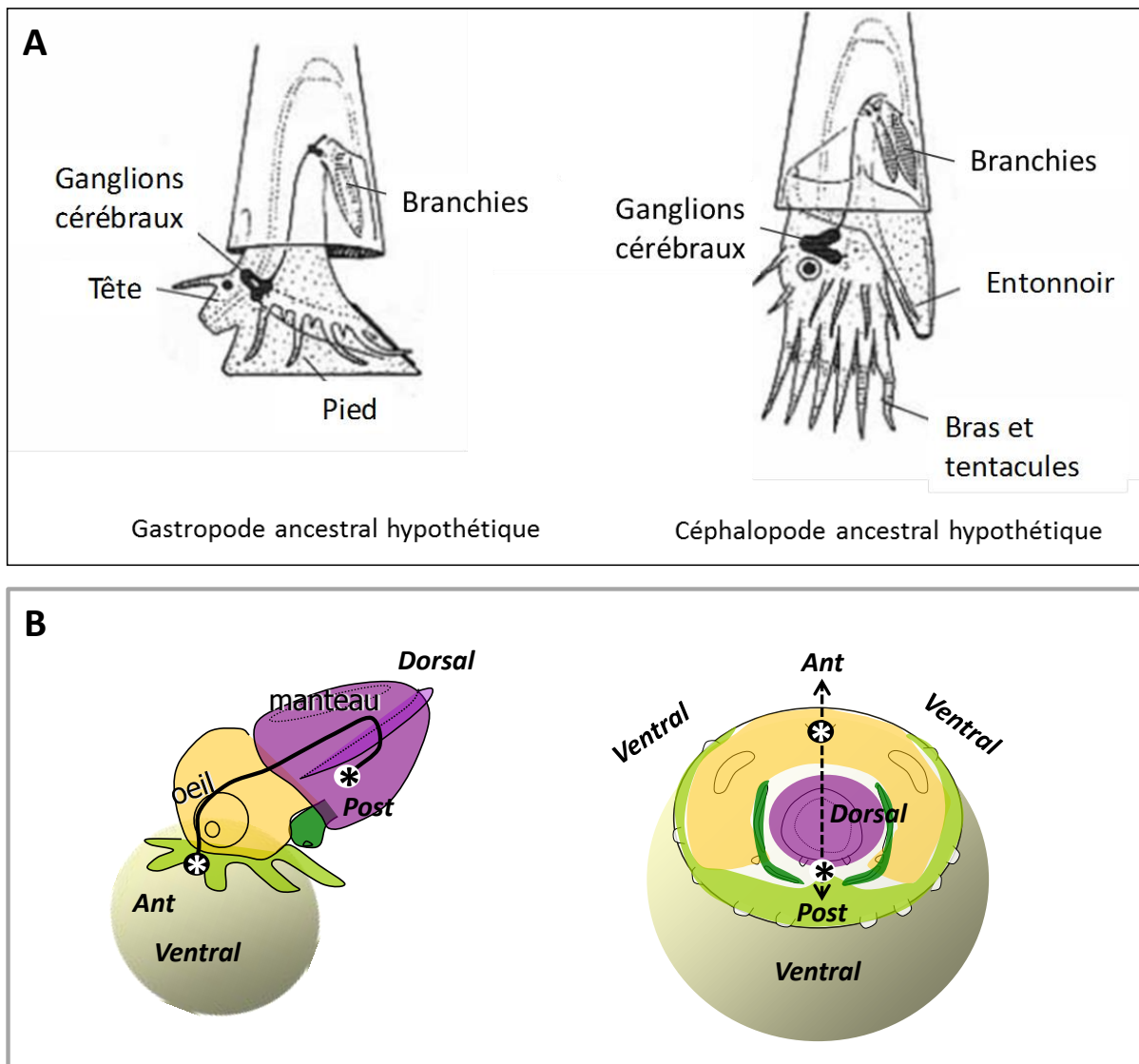


Figure 14 : Orientation des céphalopodes. A) Illustration présentant un gastropode et un céphalopode la tête en bas pour évoquer l'homologie potentielle des bras des céphalopodes avec le pied des gastropodes. Tiré de Naef, 1928. B) Orientation embryonnaire hypothétique autre que l'orientation physiologique chez *S. officinalis*. A gauche : schéma d'un stade 26 en phase de croissance. L'axe antéro-postérieur est défini par l'axe bouche-anus (astérisque blanche fond noir et astérisque noir fond blanc respectivement), il est donc courbé. Les bras sont situés ventralement face vitellus, le manteau est dorsal. A droite : schéma d'un stade 16 reprenant l'orientation du stade 26. L'axe antéro-postérieur suit l'axe bouche-anus est n'est pas encore courbé mais linéaire. Le ventre est à la périphérie de l'embryon, le dos au centre.

Les axes antéro-postérieur et dorso-ventral des céphalopodes pourraient ainsi ne pas présenter le schéma classique de deux axes perpendiculaires (**Fig. 14 B**) que les organismes modèles

(souris, drosophile et annélides) nous habituent à considérer. Des études moléculaires de gènes de régionalisation pourraient notamment apporter des éléments au vue de la compréhension de l'orientation embryonnaire des céphalopodes. Nous pouvons notamment nous demander dans quelle mesure les bras et la partie céphalique présentent les mêmes marqueurs de position. Ce questionnement est d'autant plus intéressant dans un contexte évolutif, de par l'origine hypothétique de la couronne brachiale qui dériverait du pied des mollusques, ce qui reste toujours à prouver d'un point de vue moléculaire. Ainsi pouvons-nous nous demander si les bras présentent des informations de positionnement globales liées à leur origine ou à leur position dérivée.

VI Le système nerveux juvénile et adulte

1- Organisation générale

L'anatomie du système nerveux de *S. officinalis* est bien décrite chez l'adulte notamment grâce aux travaux de Young et Boycott (Boycott, 1961 ; Young, 1971 ; Young, 1991). Le système nerveux de *S. officinalis* comprend (**Fig. 15**) :

- Le cerveau, constitué de masses elles-mêmes sous-divisées en de nombreux lobes fonctionnellement hiérarchisés. Dans les lobes, les corps cellulaires des neurones se localisent à leur périphérie, formant le cortex cellulaire, tandis que les neurites (axones, dendrites) sont concentrés au centre des lobes, formant ainsi le neuropile (Mangold, 1989).
- Les lobes optiques, situés de part et d'autre du cerveau ;
- Les ganglions périphériques tels que les ganglions buccaux au niveau du bulbe buccal à l'avant du cerveau, les ganglions intrabrachiaux dans les bras, les ganglions stellaires dans le manteau auxquels s'ajoutent d'autres petits ganglions tels que les ganglions branchiaux au niveau des branchies et d'autres au niveau des viscères ;
- Les nerfs ;
- Les récepteurs sensoriels périphériques situés au niveau des bras (ventouses), des yeux (rétine), et de la peau (lignes latérales, cellules sensorielles épidermiques, organes olfactifs et statocystes) (**Fig. 15**).

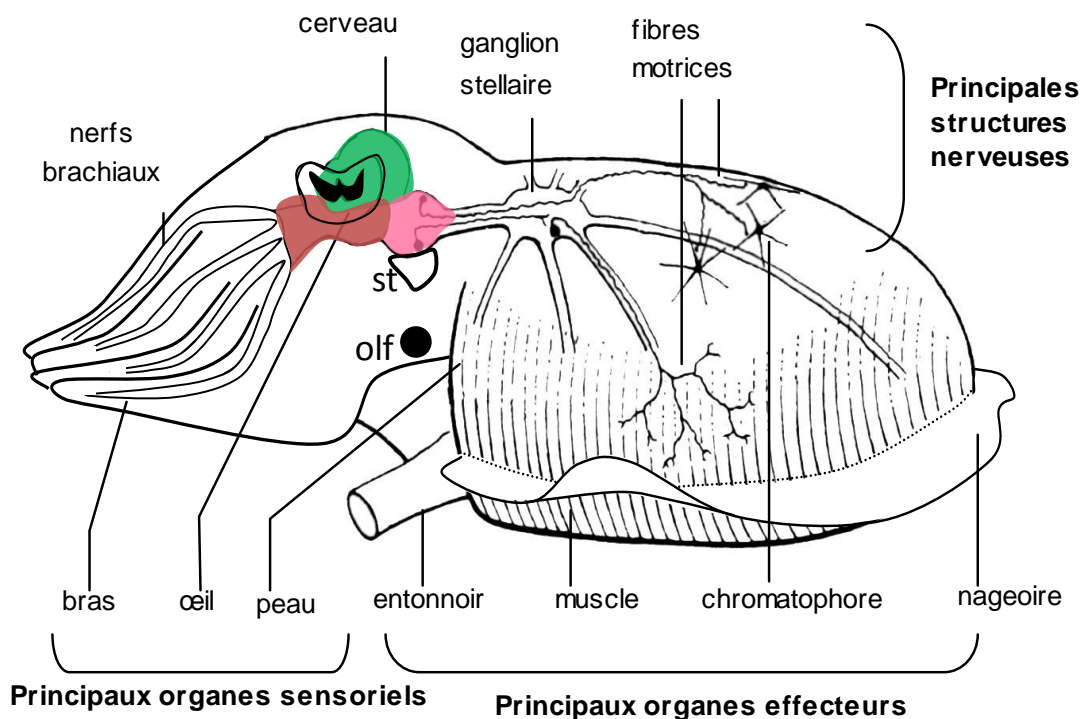


Figure 15 : Organisation générale du système nerveux de *S. officinalis*. Schéma d'une seiche adulte présentant les principaux organes sensoriels, les principales structures nerveuses et les principaux organes effecteurs. Les informations provenant du cerveau effectuent un relai au niveau du ganglion stellaire avant d'aller innervé les muscles. D'autres fibres ne font que passer par le ganglion stellaire sans y faire de relais et innervent directement les chromatophores. Les différentes masses du cerveau sont colorées. En vert : masse supra-œsophagienne SPM ; en rouge : masse sous-œsophagienne antérieure et médiane ASM, MSM ; en rose : masse sous-œsophagienne postérieure PSM. olf : organe olfactif ; st : statocyste.

Les termes de système nerveux central et périphérique tels qu'ils sont employés dans la littérature relative aux céphalopodes désignent souvent différents ganglions en fonction de leur localisation dans l'animal (Boletsky, 1988). D'après les définitions de Bullock & Horridge, (1965) et de Richter et al. (2010) (Partie I Chapitre 1) et compte tenu de ce qui est qualifié de central chez les vertébrés et les insectes, tous les ganglions des mollusques devraient être considérés comme étant des composantes du système nerveux central, même s'ils ne sont pas disposés en une chaîne ganglionnaire continue. La difficulté de discriminer le SNC du SNP chez les mollusques est d'autant plus réelle que les ganglions émergent tous à partir de territoires ganglionnaires séparés (Nielsen, 2005), contrairement au tube neural des vertébrés et

aux neuroblastes des insectes. En réalité, tous les ganglions de la seiche sont centralisés d'un point de vue fonctionnel, même si leur localisation est périphérique. Le SNP des mollusques devrait logiquement faire référence aux nerfs et aux récepteurs sensoriels périphériques. Ainsi, pour éviter toute confusion, je parlerai de ganglions « centraux » (ceux situés au niveau de la tête) et de ganglions périphériques (et pas de système nerveux périphérique) pour faire référence à la position des ganglions dans l'embryon, de manière à ne pas induire une idée d'homologie avec le SNP des vertébrés. Cette précaution s'avèrera plus pratique dans mon approche évolutive et comparée.

2- Le cerveau et les lobes optiques

Le cerveau

La distribution hiérarchique des fonctions au sein du cerveau des céphalopodes conduit souvent à le considérer comme étant analogue fonctionnellement à celui des vertébrés (convergence évolutive). Le haut degré de spécificité fonctionnelle associé à chaque lobe est propre aux céphalopodes au sein des mollusques qui ne présentent pas de sous-divisions de leurs masses céphaliques.

Le cerveau de *S. officinalis* se localise entre les lobes optiques. Il est protégé par une capsule cartilagineuse. Il se divise en une partie supra-œsophagienne, ou SPM, impliquée dans des fonctions motrices et cognitives et qui constitue la plus grosse partie du cerveau, et en une partie sous-œsophagienne motrice, ou SBM (**Fig. 15**). Une partie périœsophagienne fait la jonction entre les parties supra et sous œsophagiennes de chaque côté du cerveau : ce sont les lobes magnocellulaires (Young, 1939). De part et d'autre des parties périœsophagiennes se disposent les larges lobes optiques, reliés à la partie supra-œsophagienne par des tractus optiques.

Chaque partie est composée de nombreux lobes fonctionnellement hiérarchisés. Des expériences d'électrostimulation des régions du cerveau ont largement participé à la compréhension de l'organisation fonctionnelle des différentes parties cérébrales (Boycott, 1961) et ont permis de déterminer plus précisément les rôles et connexions entre les différentes parties du cerveau de *S. officinalis* (Chichery & Chanelet, 1976, 1978). Deux catégories de centres nerveux ont notamment été établies à partir de ces expériences au niveau de la masse

supra-œsophagienne (ou SPM) (Boycott, 1961) (se référer à la **figure 18** pour la visualisation des différents lobes). Les centres moteurs supérieurs, au sein desquels une stimulation électrique provoque une séquence élaborée d'un comportement normal. Il comprend les lobes basaux antérieur, médian et latéral. Les informations efférentes aux centres supérieurs transitent par les centres qualifiés d'inférieurs de la masse sous-œsophagienne avant d'aller en périphérie. Les lobes basaux semblent impliqués dans des mouvements diversifiés au niveau de la tête, des yeux, de la masse buccale, des bras, des tentacules et des nageoires. Ils semblent également jouer un rôle dans le contrôle de la respiration, de la locomotion, et de la contraction des chromatophores. D'autres centres sont qualifiés d'associatifs. Ils incluent le système frontal inférieur (lobe buccal supérieur et lobe frontal inférieur), impliqué notamment dans les mouvements de la masse buccale et de la langue et le système du lobe vertical (lobe frontal supérieur, lobe vertical, lobe précommissural) qui constitue une zone silencieuse, c'est-à-dire qui ne présente aucune réponse suite à une stimulation électrique, et qui est impliqué dans l'apprentissage et la mémoire.

Deux catégories de centres nerveux ont également été établies à partir des expériences d'électrostimulation au niveau de la masse sous-œsophagienne (ou SBM). Les lobes sous-œsophagiens comportent des centres moteurs intermédiaires qui n'innervent pas directement la périphérie (effectuent un relais, au niveau des ganglions stellaires par exemple) ou inférieurs qui reçoivent les efférences des centres moteurs supérieurs de la masse supra-œsophagienne pour se projeter directement en périphérie. Un même lobe peut ainsi être considéré comme étant à la fois un centre intermédiaire et inférieur en fonction des régions du lobe et des projections nerveuses (ex. lobe palléoviscéral). La masse sous-œsophagienne antérieure (ou ASM) se compose du lobe brachial associé au système nerveux intrabrachial localisé dans les bras et tentacules. La masse sous-œsophagienne médiane (ou MSM) comprend entre autre les lobes pédieux impliqués par exemple dans les mouvements des bras et de l'entonnoir. La masse sous-œsophagienne postérieure (ou PSM) comprend par exemple des lobes palléoviscéraux. Ils jouent un rôle dans les mouvements respiratoires du manteau, de l'entonnoir, mais aussi dans les mouvements des nageoires et des bras.

Les lobes optiques

Les lobes optiques sont particulièrement imposants, et constituent plus de la moitié du volume de tous les ganglions centraux réunis (Wells, 1962). Ils sont disposés de part et d'autre du cerveau auquel ils sont rattachés *via* les tractus optiques jusqu'à la masse supra-

œsophagienne. Des stimulations électriques au niveau des lobes optiques engendrent des réactions périphériques diverses, telles que la contraction ou la dilatation des chromatophores. Or c'est essentiellement *via* une information visuelle que le profil de coloration de l'animal, en lien avec les chromatophores, est contrôlé. Les lobes optiques reçoivent directement les informations visuelles réceptionnées par les photorécepteurs des yeux, dans une zone périphérique appelée couche plexiforme, située entre deux couches granulaires.

3- Ganglions périphériques et systèmes sensoriels

Les ganglions périphériques sont majoritairement représentés par le système nerveux intrabrachial et les ganglions stellaires. Les systèmes sensoriels de *S. officinalis* comprennent des organes de vision (les yeux), de mécanoréception (lignes latérales, cellules sensorielles épidermiques, statocystes, ventouses) et de chémoréception (organes olfactifs, ventouses) (Budelmann, 1995).

Ganglions périphériques

- Le centre de **chacun des 8 bras et 2 tentacules** présente un axe nerveux central composé de ganglions très rapprochés. De nombreux nerfs partent de chaque ganglion central, notamment vers les muscles mais aussi vers les **ventouses**, impliquées dans la chémoréception et la mécanoréception (Budelmann, 1995). A la base de chaque ventouse, se situe un ganglion supplémentaire, dit acétabulaire, composé de quelques centaines de neurones. Ces ganglions sont des centres de réflexes périphériques locaux (Graziadei, 1971). Quatre cordons nerveux intramusculaires innervent les muscles, Enfin, au plafond du ganglion intrabrachial, se situe le tractus cérébro-brachial.
- Chacun des **deux ganglions stellaires** se compose d'environ 120 000 cellules nerveuses (Nixon & Young, 2003) formant ainsi le plus important carrefour nerveux du système nerveux périphérique. Le contrôle des muscles du manteau par le cerveau se fait *via* un système de fibres géantes effectuant un relais dans les ganglions stellaires. D'autres fibres en provenance du cerveau (masse sous-œsophagienne postérieure) transitent

également par le stellaire sans y faire de relais et vont innover directement les chromatophores, effecteurs musculaires qui permettent de modifier le profil de coloration de l'animal (**Fig. 15**).

Organes sensoriels

- **Les yeux** des céphalopodes présentent une cornée, un iris jouant le rôle de diaphragme, un cristallin, et une rétine. Les coléoides disposent d'yeux complexes de type camérulaire : un compartiment liquidien ou humeur vitrée sépare le cristallin de la rétine ce qui constitue une convergence évolutive avec les vertébrés (Yoshida & Ogura, 2011). Cependant, les yeux des céphalopodes et des vertébrés présentent des différences développementales et anatomiques majeures. Chez les vertébrés les yeux sont issus du tube neural, chez les céphalopodes ils se mettent en place à partir d'une invagination de l'ectoderme (Mangold, 1989). De plus, les récepteurs photosensibles sont rhabdomériques (augmentation de la surface membranaire par repliement de celle-ci) et pas ciliaire comme chez les vertébrés (augmentation de la surface membranaire par un cilium) (Arendt, 2003 ; Vopalensky & Kozmik, 2009). Chez la seiche, la cornée est percée d'un orifice qui laisse passer l'eau de mer dans la chambre antérieure de l'œil (Schaeffel et al., 1999). La rétine se compose de cellules réceptrices sensorielles, de cellules de supports et de cellules gliales (Mangold, 1989). A l'arrière de la rétine, le nerf optique projette vers le lobe optique du côté associé directement dans la couche pléxiforme.
- **Les deux statocystes** sont des structures situées à la base des ganglions viscéraux (**Fig. 15**) et sont largement impliqués dans l'équilibre (Budelmann, 1979). Ils sont considérés comme analogues au système vestibulaire des vertébrés (Williamson, 1991). Les mécanorécepteurs contenus dans les statocystes sont des récepteurs à la gravitation et à l'accélération linéaire localisés dans une région appelée la macule, et des récepteurs à l'accélération angulaire disposés dans la crête. Au centre de chaque statocyste rempli de fluide se trouve une petite structure calcaire, le statolithe. Celui-ci est en contact avec les récepteurs sensoriels condensés dans la macule. Le système macule/statolithe permet donc la gestion de la gravité. Le système crête/cupula (matrice gélatineuse dans laquelle

les cils sensoriels des récepteurs de la crête sont « embourbés ») permet quant à lui la détection de l'accélération angulaire (Budelmann, 1996 ; Williamson, 1991).

- Les **deux organes olfactifs** sont constitués de cellules chémoréceptrices. Ils se situent sous la peau mais ne sont pas totalement recouverts par l'ectoderme. Les organes olfactifs se localisent de part et d'autre de la partie céphalique, en position postérieure à la limite du manteau (**Fig. 15**).
- **Les lignes latérales** consistent en des alignements de cellules épidermiques nerveuses ciliées dont les axones projettent jusqu'au cerveau, et sont analogues aux lignes latérales mécanoréceptrices des poissons (Budelmann & Bleckmann, 1988). **Trois paires de lignes latérales** se disposent sur les bras I, II (frontalement) et III (plus latéralement), jusqu'à s'étendre largement sur la tête. Une quatrième paire s'arrête à la base des bras IV (futurs tentacules), et finit sous l'œil. Chez *Loligo vulgaris* une cinquième paire de lignes latérales s'étend sur les bras (Budelmann & Bleckmann, 1988 ; Sundermann, 1983). Ces lignes constituent des mécanorécepteurs au seuil de sensibilité relativement bas (Budelmann et al., 1991).

VII Le système nerveux embryonnaire

Si le système nerveux adulte de *S. officinalis* est bien décrit dans la littérature, sa mise en place au cours du développement n'est pas décrite. Pour la reconnaissance des structures nerveuses embryonnaires chez *S. officinalis*, nous nous appuyons sur des études histologiques qui ont été menées chez les embryons d'autres espèces de céphalopodes chez *Octopus vulgaris* (Marquis, 1989), *Sepioteuthis lessoniana* (Shigeno et al., 2001), *Idiosepius paradoxus* (Yamamoto et al., 2003). Lors de mon travail de thèse, je me suis essentiellement basée sur l'étude menée chez l'embryon *I. paradoxus* (Yamamoto et al., 2003). Ce travail de repérage et d'identification fut en soi un réel et long travail d'annotation, car des différences notables dans la morphologie des lobes et de leur cinétique de mise en place respective existent.

Voici les principales étapes de la mise en place du système nerveux au cours de l'organogenèse de *S. officinalis* (**Fig. 16**) :

- En phase 1 discoïdale (stades 15 à 20), les territoires présomptifs des futurs ganglions centraux et périphériques sont disposés symétriquement par paire tout autour de l'embryon. Les territoires cérébraux sont disposés de part et d'autre de la bouche, les territoires optiques sont derrière les vésicules optiques, les territoires pédieux se localisent en périphérie de l'embryon à la base des bras, les territoires viscéraux sont au-dessus des statocystes localisés entre les ébauches des tubes et poches de l'entonnoir, les territoires stellaires sont dans le manteau. Mes observations m'ont conduit à estimer que les territoires intrabrachiaux ne sont pas encore développés dans les bourgeons des bras. Jusqu'à mon travail de thèse, la dynamique de différenciation de ces territoires présomptifs n'avait pas été établie, ce qui posait un problème de terminologie. La question était notamment de savoir à partir de quel moment ces territoires présomptifs peuvent être qualifiés de ganglions ;
- Durant la phase 2 d'extension (stades 20 à 23) certains de ces « ganglions » vont commencer à s'agglomérer : il s'agit des ganglions centraux qui formeront le cerveau, à savoir les ganglions cérébraux, les ganglions pédieux et les ganglions viscéraux. Durant cette phase, le tissu céphalique précoce entoure largement la région cérébrale-optique et commence à être recouvert par les piliers des bras. La **figure 17** présente la disposition des tissus internes au niveau de la région cérébrale-optique en section transversale ;
- Durant la phase 3 de croissance (stade 23 à l'éclosion), ces ganglions du cerveau vont fusionner et se spécialiser. Les ganglions cérébraux vont générer la masse supra-œsophagienne, les ganglions pédieux la masse sous-œsophagienne antérieure et médiane, et les ganglions viscéraux la masse sous-œsophagienne postérieure. A partir du stade 24, les lobes sont visualisables en sections. En coupe, les ganglions centraux sont recouverts par du tissu ectodermique. Le tissu céphalique précoce s'est résorbé.

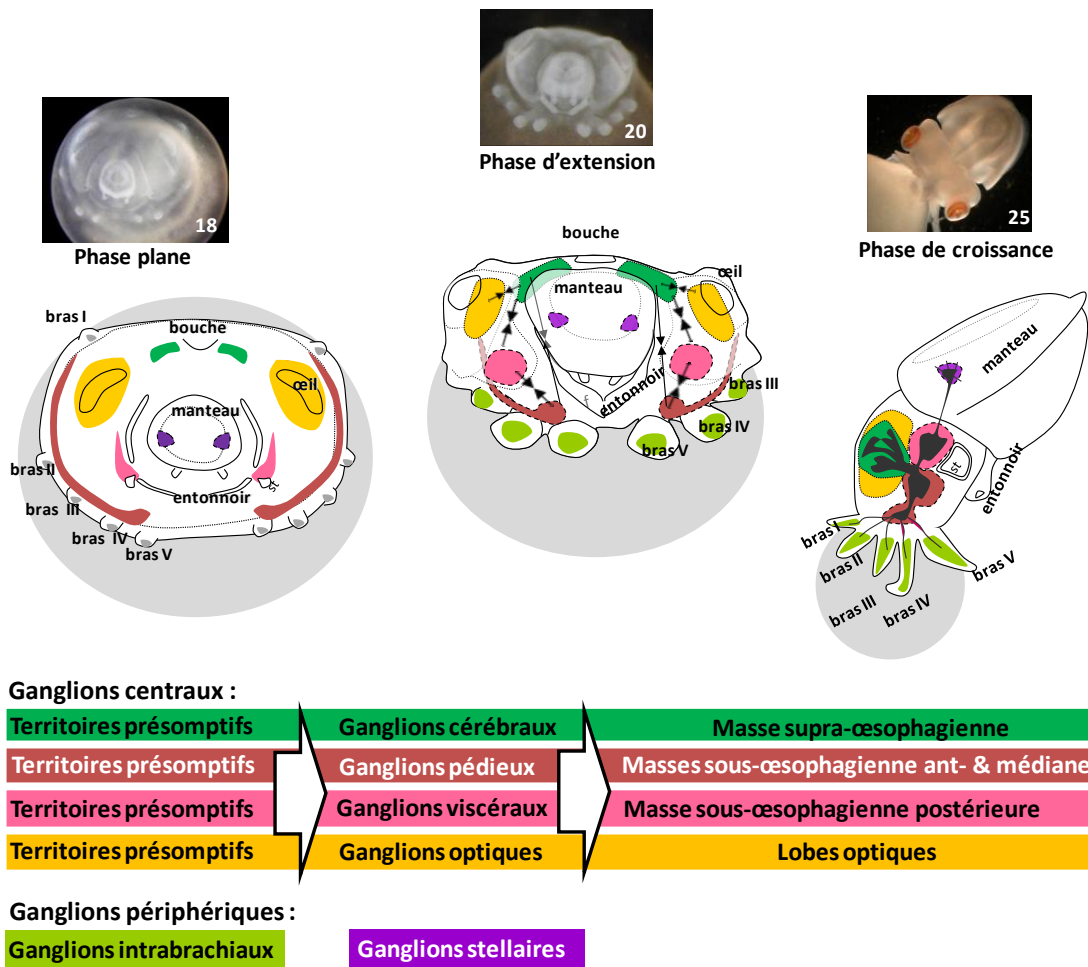


Figure 16 : Mise en place du système nerveux de *S. officinalis* au cours de l'organogenèse. Au début de l'organogenèse, les territoires présomptifs nerveux sont déjà répartis sur l'embryon mais éloignés les uns des autres. Lorsque ces territoires comportent des neurones différenciés, ils deviennent alors des ganglions. Les ganglions centraux s'agglomèrent et fusionnent durant la phase d'extension, puis se spécialisent en masses et lobes fonctionnellement hiérarchisés, la masse supra-œsophagienne étant la plus imposante au niveau du cerveau. Tous les ganglions périphériques ne sont pas indiqués. st : statocyste.



Figure 17 : Schéma d'embryon en phase 2 présentant un plan de coupe, la répartition des couches tissulaires internes visualisable après section est indiquée à droite. CG, ganglions cérébraux ; e, yeux ; en, entonnoir ; OL, lobes optiques ; PG, ganglions pédieux ; p1, piliers des bras 1.

Au stade 26, les différents lobes fonctionnellement hiérarchisés que nous avons abordés lors de la description de l'organisation du SN adulte sont identifiables, cependant de grandes différences concernant leurs proportions relatives sont observables (**Fig. 18**).

La masse supra-œsophagienne, très importante chez l'adulte, est équivalente en taille à la masse sous-œsophagienne chez l'embryon en fin d'organogenèse. Le lobe vertical en particulier présente une grande différence de taille entre l'embryon et l'adulte. En effet, le système du lobe vertical constitue 7% du volume total du cerveau à l'éclosion, contre 23% chez l'adulte (Maddock & Young, 1987). Les lobes basaux constituent quant à eux 39% du volume total du cerveau à éclosion contre 26% chez un adulte (Frösch, 1971). Il est intéressant de noter que le système du lobe vertical est largement impliqué dans les processus de mémorisation et d'apprentissage chez les céphalopodes (Messenger, 1973), ce qui pourrait expliquer sa prise de volume si conséquente après l'éclosion, chez le juvénile confronté à un nouvel environnement.

L'objet du chapitre suivant est de fournir une description comparative globale de la neurogénèse chez les bilatériens, facilitant la discussion ultérieure de mes résultats.

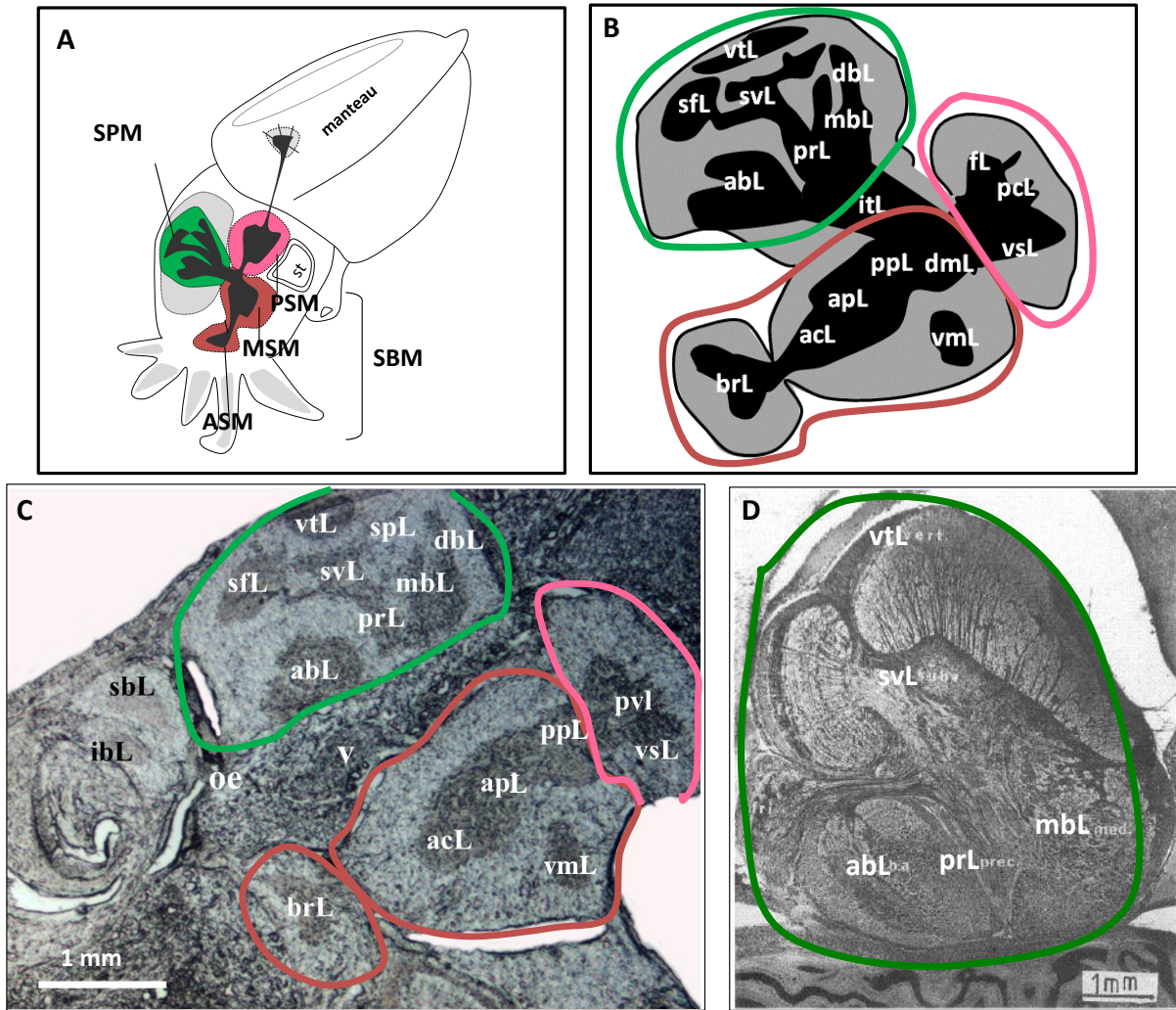


Figure 18 : Anatomie du cerveau embryonnaire de *S. officinalis* et comparaison avec l'adulte. L'avant est à gauche. A- Schéma d'un embryon stade 26 illustrant les emplacements relatifs des masses du cerveau. B- Schéma d'une coupe longitudinale latérale du cerveau d'un embryon à partir du stade 26 faisant apparaître le lobe interbasal. C- coupe longitudinale d'un embryon au stade 26 au milieu de l'animal, faisant apparaître les masses supra-œsophagienne (en vert) et sous-œsophagiennes (rouge et rose) avec leurs lobes associés, séparées par l'œsophage et du vitellus. D- Coupe longitudinale de la masse supra-œsophagienne d'un adulte illustrant les changements drastiques de proportions de certains lobes (Young, 1991). Dans la **SPM**, masse supra-œsophagienne (en vert) : **abL**, lobe basal antérieur ; **dbL**, lobe basal dorsal ; **itL**, lobe interbasal ; **mbL**, lobe basal médian ; **prL**, lobe précommissural ; **sfL**, lobe frontal supérieur ; **spL**, lobe sous-pédonculé ; **svL**, lobe sous-vertical ; **vtL**, lobe vertical. Dans la **SBM**, masse sous-œsophagienne, nous avons 1) l'**ASM**, masse sous-œsophagienne antérieure (en rouge) : **brL**, lobe brachial. 2) la **MSM**, masse sous-œsophagienne médiane (en rouge) : **acL**, lobe des chromatophores antérieur ; **apL**, lobe pédieux antérieur ; **ppL** : lobe pédieux postérieur ; **vmL**, lobe magnocellulaire ventral. 3) la **PSM**, masse sous-œsophagienne postérieure (en rose) : **dmL**, lobe magnocellulaire dorsal ; **fl**, lobe des nageoires ; **pcL**, lobe des chromatophores postérieur ; **pvL**, lobe palléoviscéral ; **vsL**, lobe viscéral. Autres : **ibL**, lobe buccal inférieur ; **oe**, œsophage ; **sbL**, lobe buccal supérieur ; **st**, statocyste ; **v**, vitellus.

CHAPITRE 3 :

NEUROGENESE COMPARATIVE CHEZ LES BILATERIENS

Le terme de neurogenèse, tel qu'il sera utilisé dans ce manuscrit, désigne l'ensemble des événements conduisant à la mise en place d'un système nerveux fonctionnel au cours du développement. Il s'agit d'un processus biologique allant de la détermination précoce du neuroectoderme à la différenciation neuronale tardive.

L'objectif de ce chapitre est d'apporter une vision comparative de la neurogenèse chez les bilatériens, en se basant sur les espèces où la dynamique histologique et les mécanismes moléculaires sous-jacents ont été bien décrits. Les principaux gènes et voies de signalisation impliqués lors des étapes de la neurogenèse seront abordés au travers de quelques exemples de vertébrés, souvent chez la souris, ecdyzoaires, généralement la drosophile et lophotrochozoaires, souvent avec les annélides, et parfois les mollusques. Quelques exemples de cnidaires seront abordés.

Quatre grandes étapes caractérisent le développement des cellules nerveuses : la détermination du neuroectoderme, la détermination des progéniteurs neuraux, la spécification de l'identité neurale et enfin l'engagement dans la différenciation neuronale. Ces étapes ne sont pas exclusives temporellement, et les processus relatés dans les différentes parties peuvent être concomitants. Durant mon travail de thèse, je me suis essentiellement intéressée aux phases de **spécification de l'identité neurale** et **d'engagement dans la différenciation neuronale**. Une description succincte de toutes les étapes de la neurogenèse permet néanmoins de resituer ces deux étapes.

I Détermination du neuroectoderme

Cette première phase de la neurogenèse correspond à l'étape de détermination de l'ectoderme neurogénique, ou neuroectoderme (induction neurale chez les chordés) opposé à

l'ectoderme non neurogénique. Cette étape permet à une partie des cellules de l'ectoderme d'adopter une identité neurale. De manière générale, chez les bilatériens, le feuillet ectodermique reçoit sur une partie de sa surface des signaux provenant du mésoderme sous-jacent. Ces signaux induisent la différenciation d'une partie du tissu en neuroectoderme. L'ectoderme restant deviendra de l'épiderme. Cette différenciation de deux identités cellulaires différentes (futur tissu nerveux ou futur tissu épidermique) repose sur des gradients de molécules sécrétées, activatrices ou inhibitrices de la différenciation (notamment BMP, Wnt et Shh).

Le système nerveux des deutérostomiens (vertébrés, chordés) se met en place en région dorsale de l'embryon, tandis que chez les protostomiens (ex. insectes, annélides) le système nerveux se définit généralement en région ventrale. Parmi les premiers gènes de développement impliqués, ceux codant pour la protéine Bone morphogenetic (Bmp/Dpp) et sa voie de signalisation jouent un rôle essentiel dans ce processus de détermination (Fainsod et al., 1994).

Chez les vertébrés, les gènes *bmp2/4*, codant pour des protéines sécrétées sur la face ventrale (ectoderme) de l'embryon au stade gastrula précoce, stimulent l'identité épidermique. Dans la partie dorsale, il a été montré que son expression disparaissait au profit d'une série d'antagonistes qui favorisent la détermination du neuroectoderme (Miller-Bertoglio et al., 1997 ; Yu et al., 2007 ; De Robertis, 2008) dont Noggin (Smith & Harland, 1992) et Chordin (*chd*) (Sasai et al., 1994).

Chez les ecdysozoaires protostomiens, tel que la drosophile, les gènes *decapentaplegic (dpp)* et *short of gastrulation (sog)* sont les homologues respectifs des gènes *bmp* et *chd*. Cependant même s'ils possèdent des fonctions similaires par rapport aux vertébrés, les signaux *dpp/sog* chez les ecdysozoaires présentent une expression inversée par rapport aux signaux *bmp/chd*. Il s'agit alors d'une expression dorsale pour *ddp* et ventrale pour *sog*, d'où la position ventrale du SN (**Fig. 19**) (Francois et al., 1994 ; Akiyama-Oda & Oda, 2006 ; Van der Zee et al., 2006 ; De Robertis, 2008). Ainsi de manière générale chez les vertébrés et les ecdysozoaires, le neuroectoderme se développe du côté *chd/sog*, où le signal Bmp/Dpp est inhibé.

Chez l'annélide *Helobdella*, la voie de signalisation Bmp est également retrouvée. Néanmoins chez cette espèce, l'inhibition de Bmp2/4 qui permet la mise en place du neuroectoderme s'effectue par son antagoniste Gremlin (Kuo & Weisblat, 2011).

Chez les Cnidaires, qui présentent une symétrie radiaire et un système nerveux diffus tel que l'anémone de mer *Nematostella vectensis*, des orthologues des gènes *bmp* et *chd* sont exprimés sur une même face de l'embryon (**Fig. 19**) (Rentzsch et al., 2006) et participent à la détermination du second axe embryonnaire, perpendiculaire à l'axe oral/aboral (Saina et al., 2009). Cette information révèle que le recrutement de ces gènes semble antérieur à la divergence protostomiens/deutérostomiens. Ces données pourraient soutenir l'hypothèse d'une fonction ancestrale de ces gènes davantage liée à la formation de nouveaux axes qu'à une centralisation du SN.

Durant cette première étape, l'inhibition du signal Bmp/Dpp par ses antagonistes Chd/Sog (ou Gremlin), permet donc l'acquisition d'une identité neuroectodermique chez les bilatériens.

Chez les mollusques, les mécanismes régulateurs de la détermination du neuroectoderme restent mal connus.

Même si le rôle des protéines Bmp dans la mise en place du système nerveux n'a pas été démontré chez les mollusques, elles sembleraient impliquées dans la délimitation de territoires embryonnaires chez le gastropode *Patella vulgata* (Nederbragt et al., 2002a). Des expériences de micro-injections de constructions plasmidiques comportant les gènes codant pour le récepteur Bmp d'huître *Crassostrea gigas* chez des embryons de poissons zèbres provoquent un effet ventralisant global, *via* la transduction d'un signal de type Bmp dans le mésoderme (Herpin et al., 2005), ce qui pose la question de l'existence d'une fonction ventralisante chez l'huître, non évidente au départ au vue de son organisation originale par rapport à notre perception de l'axe dorso-ventral.

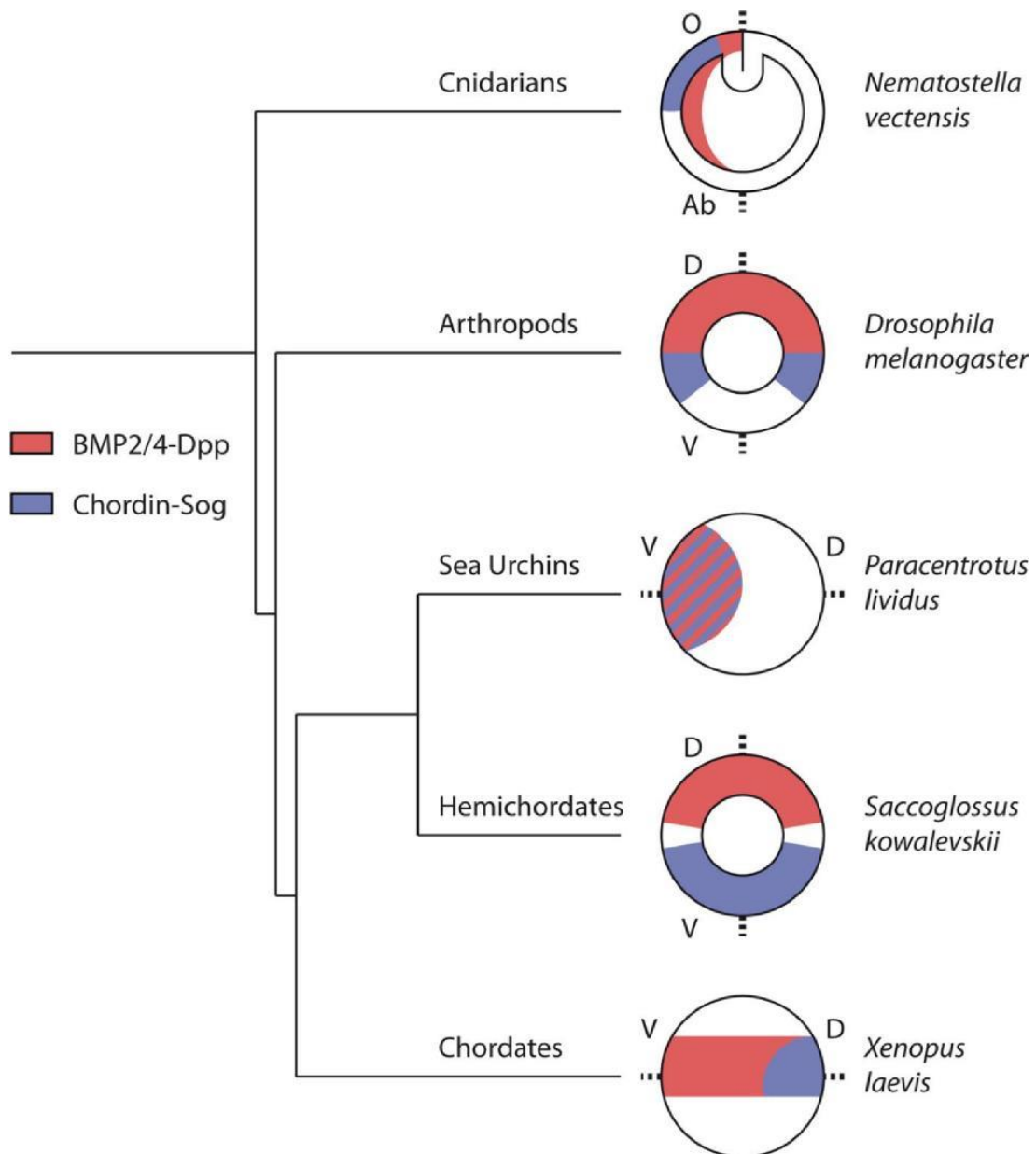


Figure 19 : Schéma comparatif des domaines d'expression des gènes *bmp2/4-dpp* et *chordin-sog* chez différents métazoaires. Alors que chez la plupart des organismes *chordin-sog* et *bmp-dpp* s'expriment dans des territoires opposés, les échinodermes et les cnidaires présentent une coexpression de ces facteurs dans le même territoire embryonnaire. O, oral; Ab, aboral; D, dorsal; V, ventral. (Lapraz et al., 2009)

II Détermination des progéniteurs neuraux

Une fois la détermination de l'emplacement et des limites du neuroectoderme achevée, la seconde étape de la neurogenèse est la détermination des cellules progénitrices neurales (NPC). Cette étape permet la sélection, au sein du neuroectoderme, des cellules pluripotentes qui donneront naissance aux neurones grâce à l'activation d'une cascade de gènes appelés gènes proneuraux. La mise en jeu de cascades d'activation contrôlées par deux éléments est nécessaire chez la plupart des bilatériens. Il s'agit des facteurs de transcription à motif basic Helix-Loop-Helix (bHLH) et de la voie de signalisation Notch-Delta.

Les gènes proneuraux ont été initialement mis en évidence chez la drosophile. Ce sont des gènes codant pour des facteurs de transcription de type bHLH (basic Helix Loop Helix) comme les groupes des gènes *achaete-scute* (Ghysen & Dambly-Chaudière, 1989) et *atonal-related* (Jarman et al., 1993; Jarman et al., 1994). Les facteurs proneuraux sont nécessaires et suffisants à la formation des neurones (Bertrand et al., 2002; Rodriguez et al., 1990).

Chez les vertébrés, il a été mis en évidence que l'expression de ces gènes déclenchait la différenciation des cellules progénitrices neurales en neurones (Campos-Ortega, 1998). Chez le xénope par exemple, les homologues des gènes *achaete-scute* et *atonal-related* sont exprimés dans les tissus nerveux durant la neurogenèse, induisant la différenciation neuronale (Ferreiro et al., 1993 ; Takebayashi et al., 1997). Chez le modèle murin, ces gènes sont exprimés dans les progéniteurs prolifératifs qu'ils entraînent vers un destin neural au détriment d'un destin glial. Dans le tube neural, les domaines d'expression des différents facteurs de transcription à bHLH neuraux se répartissent de manière ordonnée le long de l'axe dorso-ventral, générant des types de neurones spécifiques selon les territoires (Ma et al., 1996 ; Bertrand et al., 2002 ; Kiefer et al., 2005).

Chez l'annélide *Platynereis dumerilii*, les homologues des gènes *achaete-scute*, *atonal* et *neurogenin* ont été identifiés. Ces gènes (*Pdu-Ngn* et *Pdu-Ash*) sont exprimés dans l'ectoderme ventral embryonnaire pour s'étendre par la suite à une grande partie du neuroectoderme (Simionato et al., 2008).

L'étape de détermination des NPC par les protéines de type bHLH met en jeu une autre voie de signalisation : la voie Notch/Delta. Son inhibition entraîne une surproduction de neurones (Kunisch et al., 1994 ; Simpson, 1997 ; Bertrand et al., 2002). Cette voie agit principalement

via un mécanisme d'inhibition latérale qui permet la sélection d'un ou plusieurs progéniteurs neuraux au sein d'un groupe de cellules exprimant toutes des gènes proneuraux.

Au niveau de l'ectoderme ventral de la drosophile, composé de cellules quiescentes, les progéniteurs neuraux sont organisés en groupe de cellules capables de se différencier en neurones sous l'activité des gènes proneuraux (Romani et al., 1987 ; Simpson & Carteret, 1990). Dans ces « groupes proneuraux », une seule cellule de l'ectoderme va être sélectionnée pour se différencier en neurone alors que les autres cellules vont acquérir un destin épidermique. L'expression des gènes proneuraux est inhibée dans les cellules non sélectionnées pour une différenciation neuronale par l'intermédiaire de la voie Notch/Delta (Cubas et al., 1991).

Le mécanisme d'inhibition latérale est initié par l'activation des gènes proneuraux dans les précurseurs neuraux destinés à se différencier en neurones. La stimulation conduit à l'activation de la production du ligand Delta par les gènes proneuraux. Ce ligand va se fixer sur le récepteur transmembranaire Notch de la cellule voisine. Cet événement va provoquer le clivage de Notch et la translocation de la partie intracellulaire du récepteur dans le noyau. Cette partie de la protéine Notch va alors induire la transcription de gènes inhibiteurs de l'expression des facteurs proneuraux (Bailey & Posakony, 1995). Ainsi, l'inhibition latérale est une boucle de rétrocontrôle négative, initiée par l'expression des facteurs proneuraux dans une cellule, et qui se termine par une répression de l'expression des gènes proneuraux dans une cellule voisine. Ce rétrocontrôle négatif permet d'établir des différences quantitatives d'expression des facteurs proneuraux et de Delta dans des cellules qui au départ expriment toutes ces molécules de façon équivalente. Dès qu'une cellule du groupe proneural exprime des gènes proneuraux de façon plus importante, un déséquilibre se crée conduisant à cette boucle d'amplification. La cellule qui deviendra un précurseur neuronal, appelé neuroblaste, inhibera l'expression des facteurs proneuraux chez sa voisine qui deviendra une cellule épidermique.

Par la suite, après délamination du neuroectoderme, les neuroblastes se divisent de manière asymétrique, selon un axe perpendiculaire à la surface de l'embryon, pour donner naissance soit à une cellule mère ganglionnaire (GMC ; ganglionic mother cells), soit à un nouveau neuroblaste en position apicale (Bertrand et al., 2002 ; Skeath & Thor, 2003) (**Fig. 20**). Au cours de la neurogenèse, ce mécanisme d'inhibition latérale permet donc de réguler, chez la drosophile, la destinée cellulaire des précurseurs neuraux.

Des différences dans ces processus d'inhibition sont observées au sein même des arthropodes (Ungerer & Scholtz, 2008 ; Ungerer et al., 2011 ; Stollewerk et al., 2001). Par exemple, chez les crustacés tels que *Daphnia magna*, il n'existe pas de sélection d'un seul neuroblaste parmi un groupe proneural. Ce sont des groupes entiers de précurseurs neuraux qui sont

sélectionnés, disposés en anneaux dans le neuroectoderme (Ungerer et al., 2011). Plus tard, les neuroblastes ne subissent pas de délamination et restent à la surface du neuroectoderme (Ungerer & Scholtz, 2008 ; Ungerer et al., 2011) (**Fig. 20**). Chez l'araignée *Cupiennius salei*, des clusters de précurseurs proneuraux sont sélectionnés par la voie Notch/Delta, mais il semblerait que toutes les cellules du neuroectoderme deviennent des progéniteurs neuraux, les cellules épidermiques étant issues des régions les plus latérales de l'ectoderme (Stollewerk, 2002). Ce mécanisme rappelle le processus décrit chez les vertébrés.

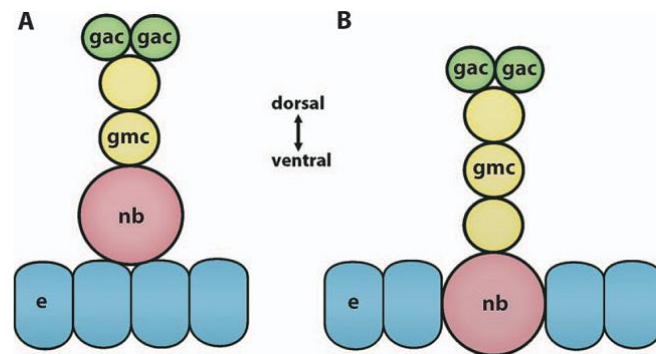


Figure 20 : Représentation schématique de l'internalisation des neuroblastes chez les insectes et crustacés.
 A. Chez les insectes, les neuroblastes se détachent de la couche ventrale ectodermique embryonnaire et se délaminent dans l'embryon vers la direction dorsale. Elle génère la cellule mère ganglionnaire qui se divise en cellules gangliogéniques (neurones et cellules gliales). B. Chez les crustacés malacostracés, les neuroblastes restent au niveau de la couche ectodermique, mais la production des cellules gangliogéniques suit ensuite le même processus que chez les insectes. e, ectoderme ; gac, cellules gangliogéniques ; gmc, cellule mère ganglionnaire ; nb, neuroblaste. (Richter et al., 2010)

En effet, chez les vertébrés ce mécanisme est différent de celui de la drosophile où les cellules du neuroectoderme peuvent acquérir un destin neuronal ou épidermique. Avant la sélection des NPC, les cellules du neuroectoderme sont déjà engagées vers une identité neurale. Celles-ci ne donneront que des structures nerveuses alors que les cellules épidermiques seront produites par l'ectoderme ventral et latéral (non neural) de l'embryon (Bertrand et al., 2002). Dans le neuroectoderme, les progéniteurs neuraux se différencient, soit précocement en neurones, soit plus tardivement en neurones ou cellules gliales. Bien que toutes les cellules soient à destin neural, on assiste à la mise en place d'un équilibre entre la prolifération et la différenciation des progéniteurs neuraux. Ainsi, tous les progéniteurs qui expriment un facteur proneural ne se différencient pas immédiatement. Chez les vertébrés, les neurones en cours de différenciation maintiennent les progéniteurs neuraux en prolifération, et ce une fois encore *via* la voie Notch/Delta (Bertrand et al., 2002). Aucune étude à ce jour ne révèle un rôle potentiel de cette voie dans la détermination neurale chez les annélides et les mollusques.

III Spécification neuronale

L'un des événements majeurs de la neurogenèse est celui qui permet aux progéniteurs neuraux d'acquérir leur propre identité (cellules gliales, neurones et sous-types associés). Cette étape à l'origine de la diversité des sous-types neuronaux est appelée la spécification neuronale. Je me suis essentiellement intéressée à cette étape de la neurogenèse durant mon travail de thèse, car elle est directement liée au **processus de régionalisation du système nerveux**.

Que ce soit chez les vertébrés ou chez les ecdyzoaires, le processus débute avec la régionalisation du neuroectoderme selon les **axes antéro-postérieur et médio-latéral** (dorso-ventral dans le tube neural). L'identité neuronale qui sera adoptée par chaque progéniteur neural dépendra directement de sa position dans le neuroectoderme et donc des gènes de régionalisation associés. Ce lien fonction-régionalisation neurale a été établi sur la base d'études réalisées sur des espèces aux organisations de leur corps et de leur SN clairement définies le long des axes antéro-postérieur et dorso-ventral.

Afin de mieux appréhender la dynamique de régionalisation, nous devons considérer la dynamique d'internalisation des neuroblastes à la base de la formation du système nerveux

central. Chez la drosophile et chez les annélides, ce processus se fait par délamination (ou ingression) des cellules du neuroectoderme comme nous l'avons abordé dans la partie précédente. Réparties de part et d'autre de la ligne médiane, elles présentent une régionalisation médio-latérale, la partie médiane correspondant à la partie la plus ventralisée du SN. Chez les vertébrés, l'internalisation se fait par invagination du neuroectoderme. Le neuroectoderme de la ligne médiane (central) s'invaginera en premier, formant la partie ventrale du tube, tandis que les extrémités latérales du neuroectoderme seront les dernières à s'internaliser et formeront la partie dorsale du tube. Ainsi, bien que les processus d'internalisation soient différents, c'est bien la partie centrale qui constitue la zone ventrale du SNC, les parties dorsales provenant toujours du neuroectoderme latéral (**Fig. 21**).

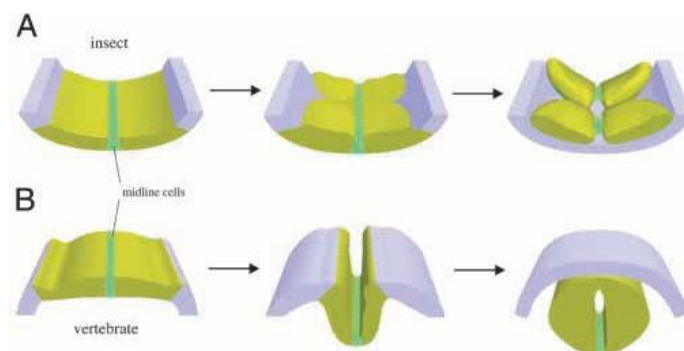


Figure 21 : Représentation schématique de la mise en place de la chaîne ganglionnaire ventrale d'un prototype insecte (A) et du tube neural dorsal d'un prototype vertébré (B). Les flèches indiquent différentes étapes d'ontogenèse. Vert-jaune : neuroectoderme ; bleu : épiderme. (Arendt & Nübler-Jung, 1999)

Chez les mollusques, les ganglions se forment par l'accumulation de neuroblastes issus de placodes ectodermiques dispersées sur l'embryon (Moor, 1983 ; Jacob, 1984). Ces régions prolifératives sont multiples et présentent donc des origines indépendantes (Nielsen, 2005). Les mécanismes moléculaires à la base de la formation et de l'internalisation des neuroblastes sont inconnus. Au début du développement, des études de la neurogenèse chez l'aplysie par coloration histologique à la thymidine tritiée (Jacob, 1984) ont mis en évidence que ces zones prolifératives se forment dans des régions ectodermiques adjacentes à des couches mésodermiques. Morphologiquement, les cellules présentent alors une forme colonnaire. Les mitoses qui ont lieu dans la zone proliférative vont former des cellules qui semblent se

délaminer vers l'intérieur, formant dans un premier temps des placodes multicouches au centre de chaque zone, pour finalement former les ganglions (**Fig. 22**). Ce processus présente beaucoup de similitudes dans le mode de formation et d'internalisation des cellules de la crête neurale des vertébrés. D'une même manière le tube neural précoce consiste en des cellules colonnaires, également ciliées, avec une apparence pseudostratifiée. Ce sont aussi ces cellules qui vont conduire à la formation des cellules gliales et des neurones. Enfin, les divisions cellulaires semblent symétriques (pas de divisions asymétriques), contrairement à ce qui est généralement observé chez les autres non-vertébrés.

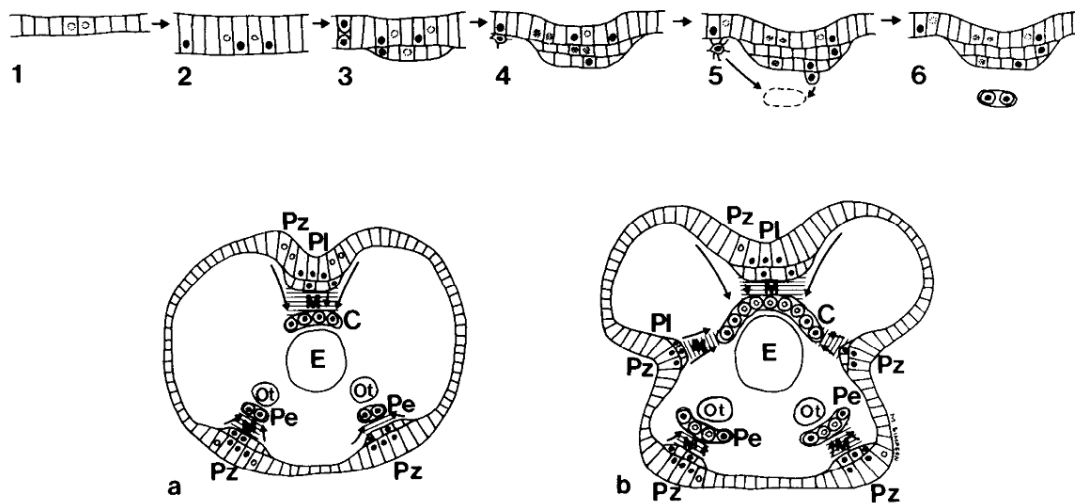


Figure 22 : Représentation schématique de la neurogenèse chez le mollusque *Aplysia californica*. Les zones prolifératives de l'épiderme sont à l'origine de la formation des ganglions composants le SN. 1-6 : dynamique de la prolifération des cellules dans les zones prolifératives. Les zones prolifératives contiennent des cellules ectodermiques qui adoptent une forme colonnaire (1 et 2). Au niveau de chaque zone proliférative se forme une placode multicouche (PI) (2 à 4). a et b : sections transversales d'un embryon au stade gastrula et d'une larve trochophore respectivement. Les zones prolifératives (Pz) s'établissent dans des régions ectodermiques adjacentes à du mésoderme (M). Chaque ganglion (C, cérébral, Pe, pédal seulement spécifiés ici) se forme à partir de cellules provenant d'une seule zone proliférative. E, œsophage, Ot, otocyste. Notons que les mollusques n'étant pas segmentés, les ganglions s'agencent par paire unique, par conséquent toutes les sections ne permettent pas de visualiser le système nerveux. (Jacob 1984)

Si l'origine embryonnaire des neuroblastes semble présenter des similitudes avec les organismes vertébrés, insectes et annélides, le neuroectoderme semble discontinu ce qui a pour conséquence la formation de ganglions épars dans l'embryon. Ce n'est que plus tardivement que certains ganglions qualifiés de centraux vont se regrouper, tandis que d'autres qualifiés de périphériques restent isolés, **ce qui pose la question de la dynamique de régionalisation et de différenciation ganglionnaire.**

1- La régionalisation antéro-postérieure

Chez les vertébrés, la régionalisation antéro-postérieure de l'embryon débute en même temps que la détermination du neuroectoderme et met donc en jeu des voies de signalisation décrites dans les paragraphes précédents. En effet, la différenciation du tube neural s'accompagne d'une modulation de l'expression génique dans la notochorde, la plaque préchordale, le tube neural et met en jeu des signaux tels que les FGF, l'acide rétinoïque et WNT (Gavalas & Krumlauf, 2000 ; Koshida et al., 1998 ; Yamaguchi, 2001). Ces signaux ne sont par ailleurs pas les seuls impliqués dans cette régionalisation. Les gènes codant pour les facteurs de transcriptions Otx et ceux du complexe Hox notamment sont indispensables à la mise en place de l'axe antéro-postérieur. L'expression de ces gènes induira une subdivision de chaque région du SNC selon cet axe.

Les gènes de la famille *otx/otd* codent des facteurs de transcriptions connus pour leur rôle essentiel dans la spécification de structures photosensibles et du système nerveux antérieur : chez les vertébrés (**Fig. 23 A, B**) (pour revue voir Simeone, 1998 ; Acampora & Simeone, 1999 ; Martinez-Morales et al., 2001 ; Plouhinec et al., 2005), et chez les ecdysozoaires (**Fig. 23 C**) (*Drosophila*) où *orthodenticle* joue un rôle majeur dans la mise en place du cerveau rostral (Acampora et al., 2000 ; Cohen & Jurgens, 1990 ; Finkelstein et al., 1990 ; Vandedries et al., 1996 ; McDonald et al., 2010). De nombreuses études sur la souris ont mis en avant les expressions d'*otx1* et d'*otx2* durant cette phase de régionalisation au niveau du mésencéphale (Simeone et al., 1992a ; Millet et al., 1996 ; Acampora et al., 1997). Ces gènes étant limités au

cerveau antérieur et moyen, ils participent au positionnement de la frontière cerveau moyen/cerveau postérieur (MHB).

Chez les lophotrochozoaires, les homologues d'*otx* s'expriment également dans des précurseurs de structures antérieures : au niveau du péristomium et autour du stomodeum des larves des annélides *Hydroides elegans* et *Platynereis dumerilii* (**Fig. 23 D**) (Arenas-Mena & Wong, 2007 ; Steinmetz et al., 2011), dans la larve du brachiopode *Terebratalia transversa* (Passamaneck et al., 2011), chez l'adulte des plathelminthes (*Dugesia japonica*, Umesono et al., 1999), avec notamment des expressions localisées en partie antérieure lors des processus de régénération (*Dugesia tigrina*, Stornaiuolo et al., 1998). **Chez les mollusques**, les gènes *otx/otd* ont seulement été étudiés chez la larve trochophore du gastropode *Patella vulgata*. *Pv-otx* s'exprime dans les zones sensorielles autour du stomodeum et de la prototroche, et dans des cellules supposées être des précurseurs neuraux (Nederbragt et al., 2002b) (**Fig. 23 E**).

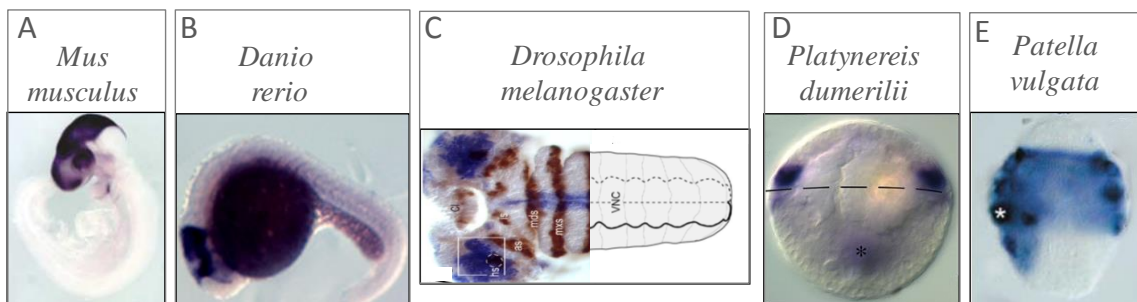


Figure 23 : Expression d'*otx/otd* chez différentes espèces de bilatériens. *M. musculus* : Bulfone et al., 2004 ; *D. rerio* : Kurokawa et al., 2006 ; *D. melanogaster*, Urbach, 2007 ; *P. dumerilii*, Steinmetz et al., 2010 ; *P. vulgata* : Nederbragt et al., 2002b. La région antérieure est à gauche. Pour les larves, un astérisque marque l'emplacement du stomodeum.

De même, des travaux menés sur les gènes *hox* chez les vertébrés ont montré qu'en présence d'une modification de la combinaison de leur expression, des anomalies de positionnement des rhombomères pouvaient être observées (Hernandez et al., 2004 ; Moens et al., 1996 ; Prince et al., 1998 ; Wiellette & Sive, 2003). Ce processus de régionalisation est également retrouvé chez l'amphioxus, l'ascidie et l'hémichordé, suggérant une implication conservée des gènes *hox* dans la mise en place de la régionalisation antéro-postérieure à l'échelle des deutérostomiens (Holland & Holland, 1996 ; Holland & Garcia-Fernandez, 1996 ; Lowe et al., 2003).

Chez les ecdysozoaires, le mécanisme initial de régionalisation présente des différences. Chez la drosophile par exemple, avant même que ne soient formées les premières ébauches de segments, l'embryon syncytial est déjà polarisé et régionalisé le long de l'axe antéro-postérieur par des déterminants maternels qui vont déterminer la disposition des neuroblastes au sein de chaque hémisegment (Bhat, 1999 ; Skeath & Thor, 2003). Ce n'est que par la suite que les voies *Otd* et *Hox* sont recrutées afin de définir la régionalisation du SNC (Reichert & Simeone, 2001 ; Lichtneckert & Reichert, 2005).

Ainsi malgré des disparités dans la mise en place du SN et dans la régulation de la régionalisation chez les vertébrés et chez les ecdysozoaires, on remarque une conservation de la régionalisation antéro-postérieure du SNC selon l'expression des gènes *otd/otx* et ceux du complexe *Hox* (Reichert & Simeone, 2001) (**Fig. 24**).

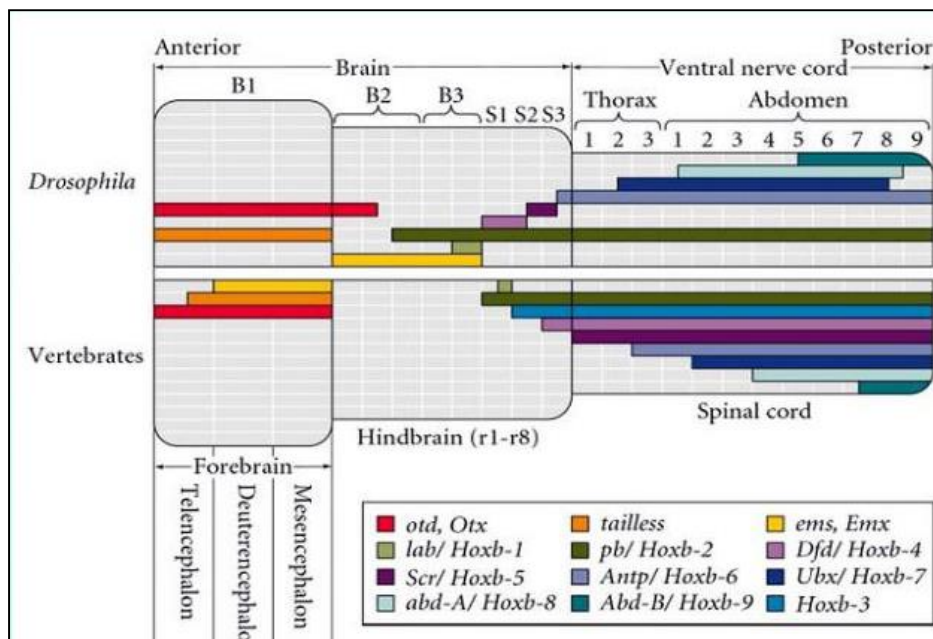


Figure 24 : Conservation de la régionalisation antéro-postérieure du SNC par expression des gènes *otd/otx* et *hox* chez la drosophile et la souris. Dans les ganglions cérébraux de drosophile : B1 : protocerebrum, B2 : deutocerebrum, B3 : tritocerebrum, S1 : neuromère mandibulaire, S2 : maxillaire, S3 : labial. Dans le cerveau de souris : r : rhombomères. (Source : ©2000 Sanauer Associates, Inc.)

D'autres gènes semblent régir les processus de régionalisation A/P du SN. Les gènes *nk2.1/sro* sont par exemple exprimés de manière conservée dans la partie antérieure médiane du neuroectoderme chez les vertébrés (**Fig. 25 A, B**) (Shimamura et al., 1995 ; Pera & Kessel, 1998 ; Small et al., 2000 ; Ogasawara et al., 2001), les ecdyzoaires (**Fig. 25 C**) (Harfe & Fire, 1998 ; Zaffran et al., 2000) et les lophotrochozoaires (*Platynereis dumerilii*, Tessmar-Raible et al., 2007 ; *Terebratalia transversa*, Santagata et al., 2012) (**Fig. 25 D, E**). Ce gène n'avait jamais été étudié chez un mollusque avant ce travail de thèse.

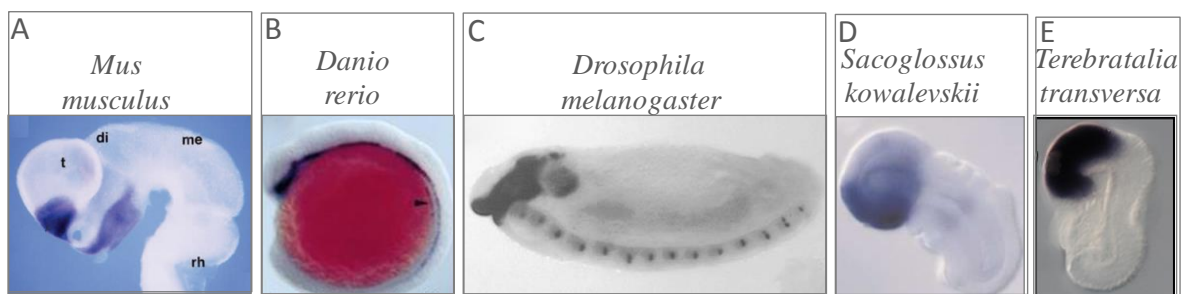


Figure 25 : Expression de *nk2.1/sro* chez différentes espèces de métazoaires. Les orthologues s'expriment au niveau oral/antérieur ventral des larves ou embryons. *M. musculus* : Shimamura et al., 1995 ; *D. rerio* : Biemar et al., 2001 ; *D. melanogaster* : Zaffran et al., 2000 ; *S. kowalevskii* : Lowe et al., 2003 ; *T. transversa* : Santagata et al., 2012. La face antérieure/orale/apicale est à gauche.

La famille de gènes *gsx/ind* présente également une implication dans la mise en place du SN antérieur. Ceci est retrouvé chez de nombreux vertébrés et chordés (**Fig. 26 A, B**) (Brooke et al., 1998 ; Hudson & Lemaire., 2001 ; Illes et al., 2009 ; Osborne et al., 2009), et chez des ecdysozoaires. *gsx* présente également une expression restreinte au pôle oral du cnidaire *N. vectensis* (**Fig. 26 C**) (Finnerty et al., 2003). Chez les lophotrochozoaires, une expression apicale est également retrouvée dans la larve de l'annélide *Capitella* au niveau de régions neuroectodermiques présomptives des ganglions cérébraux (Fröbuis & Seaver, 2006) (**Fig. 26 D**). Chez la larve du mollusque gastropode *Gibbula varia*, *gsx* s'exprime dans les aires présomptives des futurs ganglions cérébraux, autour du stomodaeum et au niveau de l'organe apical (**Fig. 26 E**) (Samadi & Steiner, 2010).

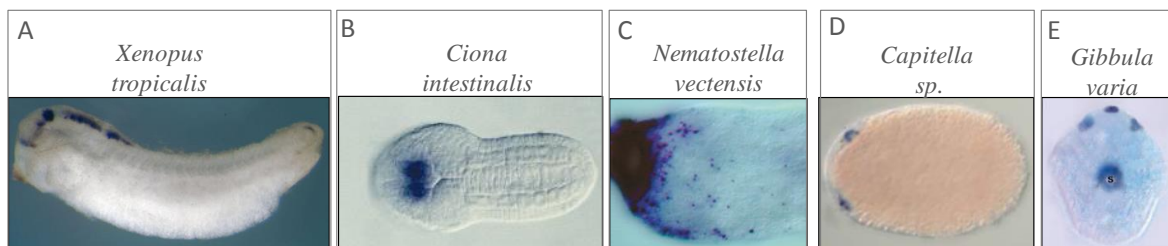


Figure 26 : Expression de *gsx/ind* chez différentes espèces de métazoaires. Les orthologues s'expriment au niveau oral/antérieur des larves ou embryons. *X. tropicalis* : Illes et al., 2009; *C. intestinalis* : Hudson & Lemaire., 2001; *N. vectensis* : Finnerty et al., 2003 ; *Capitella sp.* : Fröbius & Seaver, 2006 ; *G. varia* : Samadi & Steiner 2010. La face antérieure/orale est à gauche. Pour la larve de *G. varia*, un s marque l'emplacement du stomodeum.

Chez les bilatériens, les facteurs de transcriptions de la famille Pax jouent des rôles clés dans les processus de régionalisation du système nerveux et de spécification cellulaire (Thompson & Ziman, 2011). Présents chez tous les métazoaires, les gènes *pax* comprennent de nombreux orthologues et paralogues selon les espèces issus de la duplication d'un *pax* ancestral. Chez la souris, 9 gènes *pax* se répartissent dans les 4 groupes, en fonction de leur homologie de séquence (Walther et al., 1991). Le groupe I comprend les gènes *pax1* et *pax9*, orthologues du gène *meso* chez la drosophile. Le groupe II comprend les gènes *pax2*, *pax5* et *pax8*, orthologues de *sparkling* (ou *shaven*) chez la drosophile. Le groupe III comprend les gènes *pax3* et *pax7*, orthologues des gènes *paired*, *gooseberry* et *gooseberry neuro*. Le groupe IV enfin comprend les gènes *pax4* et *pax6*, orthologues de *eyeless* de la drosophile. Chez les lophotrochozoaires, un orthologue est généralement retrouvé par groupe. Ce sont les gènes *pax1/9*, *pax2/5/8*, *pax3/7* et *pax6* (annexe 1). Les gènes *pax* des groupes II, III et IV sont connus pour être impliqués notamment dans les processus de régionalisation médio-latérale et antéro-postérieure.

Le gène *pax6* est connu pour être un gène clé du développement des structures photosensibles chez tous les métazoaires (Kozmik, 2005), mais aussi du cerveau chez les bilatériens. Chez les vertébrés, *pax6* par exemple présente un pattern d'expression complémentaire mais non exclusif à celui d'*otx* au niveau du SN rostral (**Fig. 27 A**) (Loosli et al., 1998 ; Matsunaga et al., 2000 ; Biemar et al, 2001). Ce profil complémentaire est retrouvé dans la partie apicale de la larve du lophotrochozoaire *T. transversa* (**Fig. 27 B**).

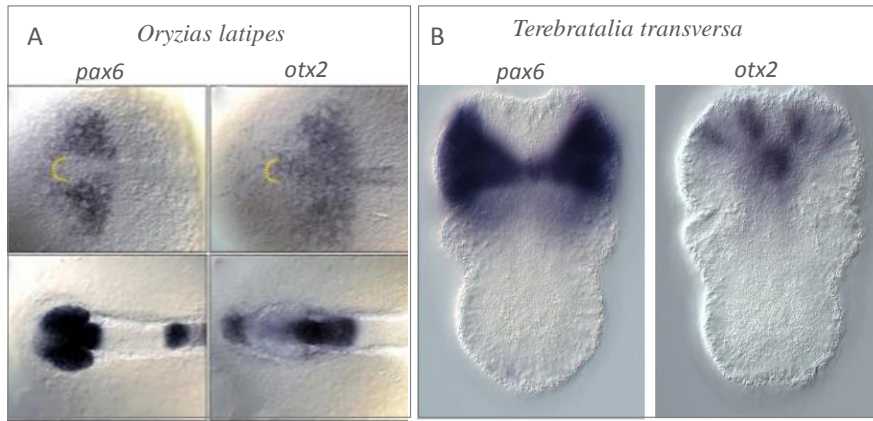


Figure 27 : Répartition de l'expression des gènes *pax6* et *otx2* chez un vertébré et un lophotrochozoaire. *O. latipes* : Loosli et al., 1998 ; *T. transversa* : Passamanek et al., 2011. Orientation médaka : antérieur à gauche. Orientation brachiopode : vue dorsale.

Chez les vertébrés, *pax2* et *pax8* sont des gènes critiques dans la mise en place de la frontière cerveau moyen/postérieur et dans la spécification des populations d'interneurones (Schwarz et al., 1999 ; Bulfone et al., 2004) (**Fig. 28**). Schwarz et al. (2000) ont mis en évidence que *pax2*, *pax5* et *pax6* subdivisent le tube neural précoce en 3 domaines ; en effet, les souris déficientes *pax2-5* ne développent pas de mésencéphalon et de métencéphalon, en conséquence le cerveau antérieur est alors collé au cerveau postérieur. Matsunaga et al. (2000), ont également mis en évidence des répartitions différentielles des gènes *pax* dans le cerveau de poulet, traduisant notamment des jeux d'inhibitions entre *pax6*, *pax2* et *pax5* et *pax7* (**Fig. 29**).

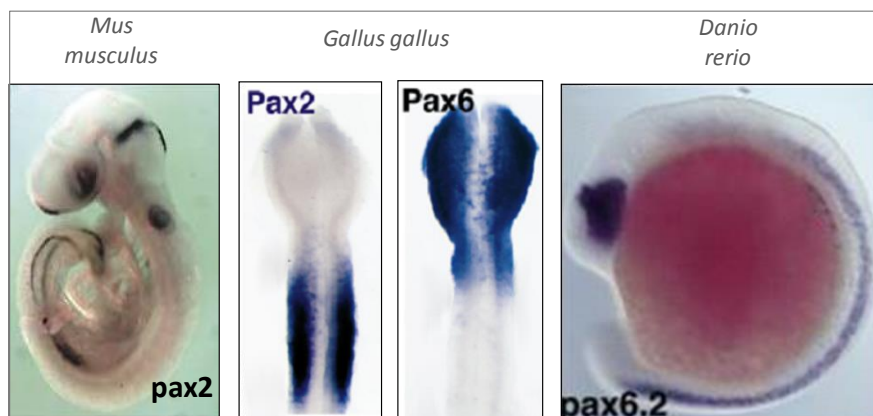


Figure 28 : Répartition de l'expression des gènes *pax2* et *pax6* chez les vertébrés. *Mus musculus* : Bulfone et al., 2004 ; *Gallus gallus* : Matsunaga et al., 2000 ; *Danio rerio* : Biemar et al, 2001. Souris et poisson zèbre : antérieur à gauche. Poussin : antérieur en haut.

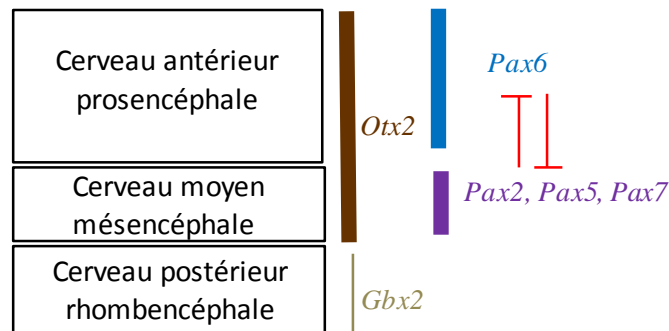


Figure 29 : Répartition de l'expression de gènes dans le cerveau de poulet. D'après Matsunaga et al., 2000.

Il s'avère cependant que la plupart de ces gènes considérés comme étant impliqués dans ces processus de régionalisation antéro-postérieure sont également connus pour participer à la mise en place de l'axe médio-latéral (dorso-ventral pour le tube neural). Cela laisse apparaître la complexité de la dynamique des étapes de régionalisations et les précautions à prendre dans l'interprétation des patterns de tels gènes, d'autant plus qu'ils sont généralement impliqués dans de nombreux autres processus développementaux non évoqués ici.

La question de conservation d'un pattern antéro-postérieur a déjà été posée chez les mollusques, se traduisant notamment par l'étude de l'expression des gènes *hox*. Des études menées chez les gastropodes *Haliothis asinina* (Hinman et al., 2003) et *Gibbula varia* (Samadi & Steiner, 2010) ont démontré une absence d'expression dans les ganglions cérébraux larvaires, les plus « antérieurs » de l'animal (ectoderme pré-trochal, épispère), avec en revanche des expressions au niveau des ganglions pédieux, pleuraux et viscéraux (d'origine post-trochale, hyosphère). De la même manière, chez le **céphalopode** *Euprymna scolopes* (Lee et al., 2003), les gènes *hox* s'expriment également dans les ganglions pédieux, viscéraux et stellaires et aucune expression de *hox* n'a été relevée dans les territoires cérébraux et optiques en région céphalique. Nous pouvons tout de même souligner quelques différences notoires entre les gastropodes et céphalopodes dans l'expression des gènes *hox* au niveau du SN: *hox1* et *post2* par exemple sont exprimés dans les ganglions pédieux d'*Euprymna* (Lee et al., 2003), alors qu'ils ne sont pas exprimés dans le SN des gastropodes. Ces différences de profils d'expression des gènes *hox* chez les mollusques démontrent « la cooptation et la flexibilité fonctionnelle de ces gènes » au cours du développement de leur système nerveux (Samadi & Steiner, 2010).

L'expression de *pax6* a également été étudiée chez les mollusques céphalopodes *L. opalescens* (Tomarev et al., 1997) *E. scolopes* (Hartmann et al., 2003), et *S. officinalis* (Navet et al., 2009). Chez ces espèces, l'orthologue du gène *pax6* s'exprime, outre dans les yeux et les aires optiques, dans les ganglions cérébraux puis dans la masse supra-œsophagienne. Ces résultats laissent fortement supposer que le gène *pax6* joue un rôle dans la mise en place des yeux chez les céphalopodes, ce qui corrobore une fonction très conservée pour ce gène dans la mise en place des structures photosensibles chez les métazoaires. Il semble également que ce gène soit impliqué dans la spécification neuronale de par son expression limitée à certains ganglions au cours du développement. Ces expressions restreintes pourraient déjà nous informer sur une régionalisation nerveuse potentielle. En effet, au niveau des ganglions centraux, *pax6* se limite aux ganglions supra-œsophagiens, et ne s'exprime pas dans les ganglions sous-œsophagiens, contrairement aux gènes *hox*.

2- La régionalisation médio-latérale : un rôle majeur des gènes columnaires

La voie Bmp/Dpp est impliquée durant cette étape de neurogenèse chez les vertébrés et ecdysozoaires. Chez la drosophile en particulier, ce sont directement les gradients de Dpp et Sog (homologues de Bmp et Chd), ainsi que la protéine maternelle Dorsal (Dl) qui vont réguler la répartition des expressions des gènes à homéoboîte *ventral nerve cord defective* (*vnd*), *intermediate neuroblast defective* (*ind*) et *muscle segment homeobox* (*msh*) qui déterminent la régionalisation médio-latérale. Ces gènes, qui se répriment transcriptionnellement les uns les autres, se répartissent le long de trois colonnes longitudinales (d'où le terme de gènes columnaires) : médiane, intermédiaire et latérale, disposées de part et d'autre de la ligne médiane ventrale (Von Ohlen & Doe, 2000 ; Gomez-Skarmeta et al., 2003 ; Skeath & Thor, 2003 ; Ramos & Robert, 2005). Dans chaque colonne, ce sont seulement les cellules des groupes proneuraux qui expriment fortement des gènes proneuraux (groupe *asc*) qui donneront naissance aux neuroblastes, eux-mêmes à l'origine des neurones dont l'identité dépendra de leur localisation médio-latérale.

Chez les vertébrés, la régionalisation dorso-ventrale fait intervenir une voie de signalisation particulière, la voie Sonic-hedgehog (Shh). Cette protéine est sécrétée par des structures

localisées ventralement par rapport au tube neural, la notochorde et le plancher neural. La protéine Shh est un morphogène qui va permettre de définir un gradient de concentration ventro-dorsal. Alors que la spécification des neurones les plus ventraux nécessite l'activité de Shh, la spécification des neurones les plus dorsaux requiert l'activité des protéines Bmp comme chez la drosophile (Mizutani et al., 2006).

Une série de gènes columnaires vont se répartir différemment le long de ce gradient ventro-dorsal (médio-latéral lorsque le neuroectoderme n'est pas encore invaginé) (Briscoe et al., 2000). Voici la répartition des gènes de régionalisation des plus dorsaux (latéraux) aux plus ventraux (médiants) (**Fig. 30A et 31**) :

- Dans la partie dorsale se répartissent les gènes dont l'expression est réprimée par le signal Shh et ainsi qualifiés de classe I : *pax3-7* (homologue de *paired*), *dbx1*, *dbx2*, *irx3* et *pax6*. Le gène à homéoboîte *msx* (orthologue de *msh*) est également retrouvé. Ce sont les gènes *pax3-7* qui se disposent longitudinalement au niveau des colonnes neuroectodermiques les plus latérales chez les vertébrés, avant l'invagination du tube neural. Ainsi une fois le tube fermé, ils se retrouveront au niveau du tube neural dorsal. Chez l'annélide *Platynereis*, on observe une répartition équivalente de ces gènes au niveau de l'axe médio-latéral (Arendt & Nübler-Jung, 1999). Chez la drosophile en revanche, l'expression des gènes *shh* et *pax3-7/paired* n'est plus columnaire comme chez les vertébrés, mais se présente en bandes segmentaires alternatives (Weiss et al., 1998 ; Arendt & Nübler-Jung, 1999 ; Wheeler et al., 2005 ; Denes et al., 2007 ; Arendt et al., 2008) (**Fig. 31**). Mentionnons également que chez *Platynereis*, l'orthologue de *shh* (*Pdu-hh*) est exprimé en bandes segmentaires et non en colonne médiane ventrale (Dray et al., 2010). Ainsi si la protéine Shh joue un rôle crucial dans la mise en place de la régionalisation dorso-ventrale chez les vertébrés, la protéine Hh ne semble pas participer à ce processus dans le neuroectoderme de la drosophile et de *Platynereis*.
- Dans la partie intermédiaire, le gène *gsx* (orthologue de *ind*) est exprimé chez les vertébrés et chez la drosophile, profil non retrouvé chez les annélides chez qui *gsx* s'exprime dans l'épispère médian (*Platynereis dumerilii* et *Nereis virens*, Hui et al., 2009 ; Kulakova et al., 2008).
- Enfin, au niveau de la partie médiane (ventrale) se répartissent les gènes dits de classe II, dont l'expression est activée par le signal Shh. Il s'agit des gènes à homéoboîte

nkx6.2, *nkx6.1*, *nkx2.2* (homologue de *vnd*), *nkx2.9* et *olig2* (Weiss et al., 1998). Parmi ces gènes, il a notamment été démontré que les expressions des gènes *nkx2.2* et *nkx6.1* sont conservés chez les vertébrés, la drosophile et les annélides (Cheesman et al., 2004 ; Arendt & Nübler-Jung, 1999 ; Arendt et al., 2008). Cependant, s'il existe une discontinuité d'expression des gènes *nk2.2/vnd* et *gsx/ind* au niveau du tube neural chez les vertébrés au profit des gènes *pax6* et *dbx* (ce qui suppose un rôle important de ces derniers dans cette phase de régionalisation du neuroectoderme) (Briscoe et al., 2000 ; Kriks et al., 2005), chez la drosophile ces gènes ne participent pas à cette étape de régionalisation (Kammermeier et al., 2001).

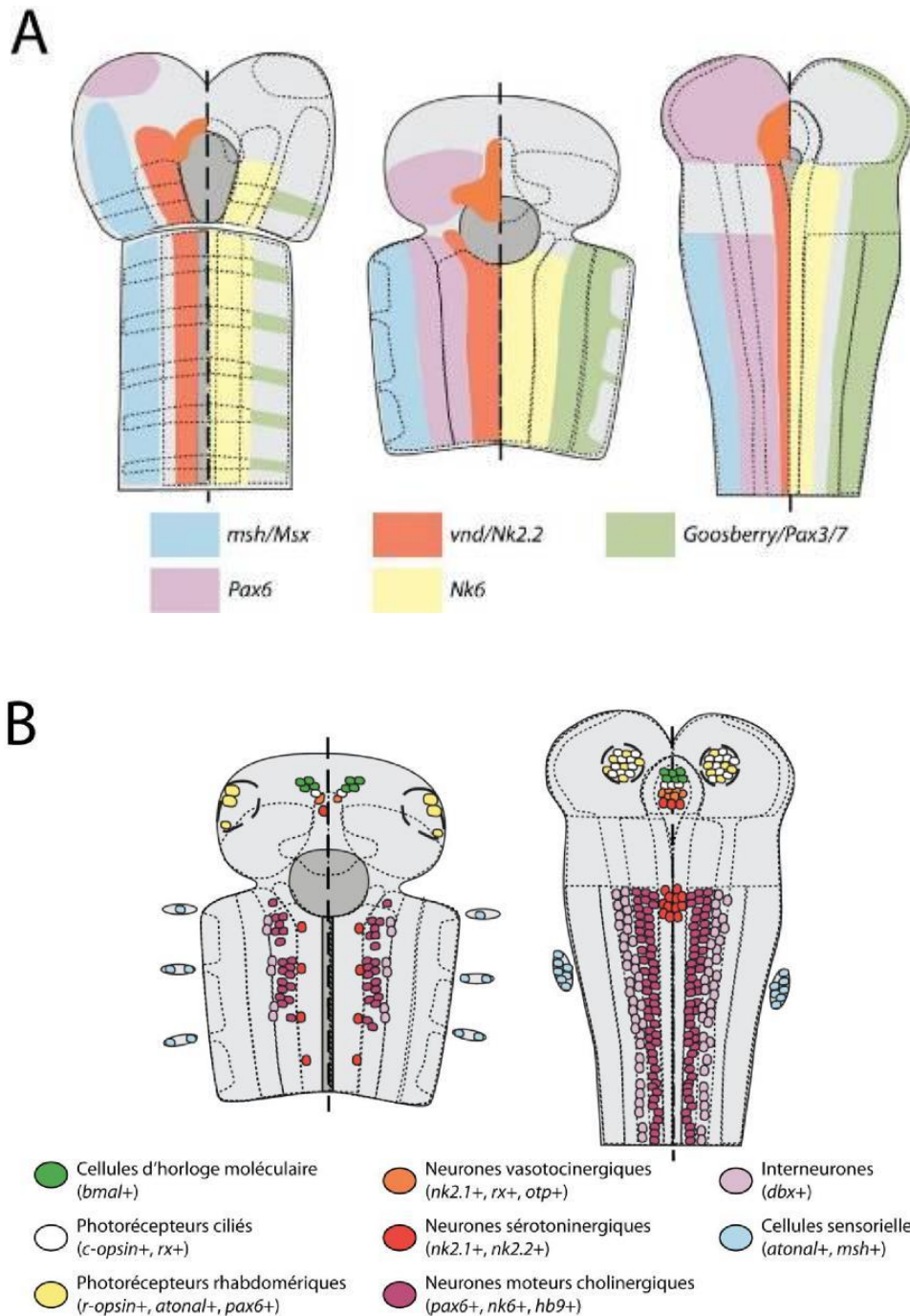


Figure 30 : Conservation de la régionalisation médio-latérale du neuroectoderme chez les bilatériens et des types cellulaires produits par chaque domaine chez la souris et *Platynereis*. Les schémas présentés sont respectivement des vues ventrales pour la drosophile et *Platynereis* et une vue dorsale pour la souris. Dans tous les cas la partie antérieure est en haut. **A**, les profils d'expression de plusieurs gènes à homéoboîte marquent la régionalisation médio-latérale. **B**, Les neurones produits dans chaque colonne neurogénique sont de type homologue chez *Platynereis* et la souris. (Arendt et al., 2008)

Selon sa position dans cet axe, chaque progéniteur neural reçoit une concentration différente de ces molécules, ce qui entraîne l'expression de différentes combinaisons de facteurs de transcriptions qui constituent des informations de position (Briscoe, 2009 ; Liu & Niswander, 2005 ; Lupo et al., 2006). La régulation des limites d'expression entre les différentes colonnes s'effectuent par le biais de répressions réciproques (Guner & Karlstrom, 2007) (**Fig. 31**).

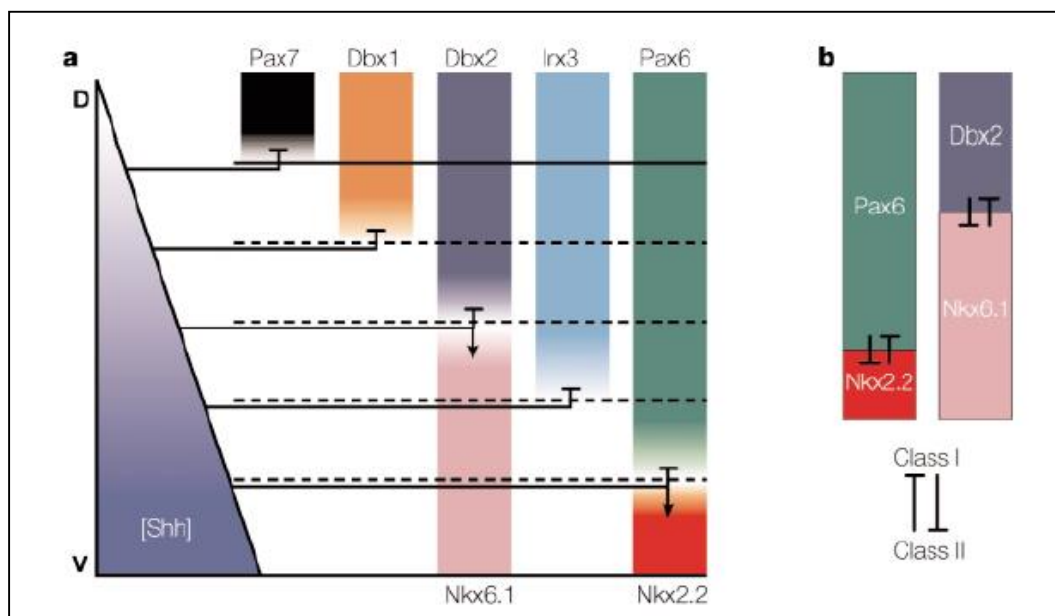


Figure 31 : La régionalisation dorso-ventrale dans le tube neural dépend du gradient de Shh. a : Shh inhibe l'expression des gènes de classe I (*pax7*, *dbx1*, *dbx2*, *irx3* et *pax6*) et induit l'expression des gènes de classe II (*nkx6.1* et *nkx2.2*) à différents seuils de concentrations. b : inhibition des protéines à homéodomaines de classe I et II. (Jessel, 2000)

Chez la larve du **gastropode *Patella vulgata***, *hh* s'exprime au niveau médian de la larve trochophore, suivant l'axe bouche-anus en passant par le pied (Nederbragt et al., 2002c), profil d'expression qui rappelle l'aspect médian retrouvé chez les vertébrés.

Chez *S. officinalis*, une étude, au sein de l'équipe, a démontré que **l'expression de *shh* ne se superpose pas à celle de *pax6*** au cours du développement (Navet et al., 2009) (**Fig. 32**). Ces

premiers résultats vont dans le sens d'une exclusion *shh-pax6* déjà mise en évidence chez les vertébrés. L'exclusion réciproque de ces gènes n'est pas limitée aux seuls territoires nerveux. En effet, si *pax6* semble s'exprimer majoritairement dans des structures nerveuses (lobes optiques et ganglions cérébraux), *shh* s'exprime au niveau de l'entonnoir et des statocystes, et semble fortement impliqué dans la mise en place de la bilatéralité de l'embryon (Navet et al., 2009).

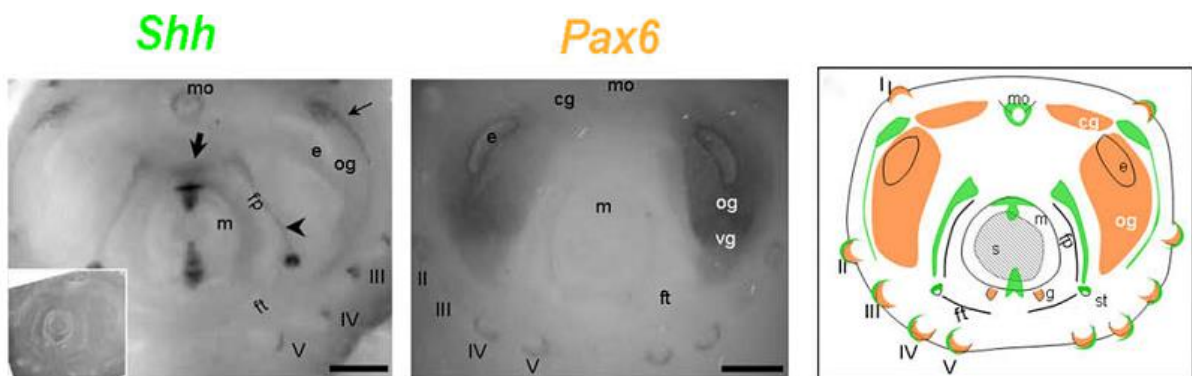


Figure 32 : Comparaison de l'expression des gènes *shh* et *pax6* au cours du développement de *S. officinalis*. Les zones d'expression des deux gènes ne se recouvrent pas, ce qui laisse fortement supposer des processus d'inhibition réciproque comparables à ce qui est observé chez les vertébrés. D'après Navet et al., 2009.

Cette étude laisse ainsi apparaître qu'il n'est pas forcément pertinent de chercher à définir une régionalisation restreinte au système nerveux à partir de ces gènes, mais que leur expression peut faire ressortir des **territoires embryonnaires** délimités. Cette observation est d'autant plus intéressante dans notre questionnement d'évolution du système nerveux. **Ainsi, les gènes de régionalisation médio-latérale et antéro-postérieure du système nerveux des vertébrés, insectes et annélides pourraient être plus largement impliqués dans des processus de régionalisation embryonnaire globaux chez les mollusques qui ne disposent pas d'un axe nerveux médian, pouvant être notamment en lien avec des aspects fonctionnels.**

Mon travail de thèse a consisté à élargir l'étude de l'expression de ces gènes de régionalisation, de manière à tester les hypothèses de la conservation des mécanismes médio-

latéraux et antéro-postérieur chez les mollusques céphalopodes. **Les profils d'expression de l'ensemble de ces gènes de régionalisation chez *S. officinalis* font-ils ressortir des processus d'interactions entre ces gènes, pouvant illustrer un pattern médio-latéral ou antéro-postérieur conservé ?**

Chez les insectes, vertébrés et annélides, une fois les expressions différentielles des gènes columnaires bien délimitées, différents types de cellules seront produits au cours du temps à partir des progéniteurs neuraux (**Fig. 30B et 33**). Ainsi, dans la partie dorsale *msx/msh+* seront par exemple spécifiés les neurones sensoriels chez les insectes, vertébrés et annélides (Mizutani & Bier, 2008). Néanmoins, la distribution medio-latérale des neurones présente des différences entre les groupes. Les motoneurones somatiques apparaissent au niveau des domaines *pax6+/nk6+* chez les vertébrés (Jessell, 2000) alors que chez la drosophile, on observe une distribution totale de ce type de neurones au niveau médio-latéral (Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997).

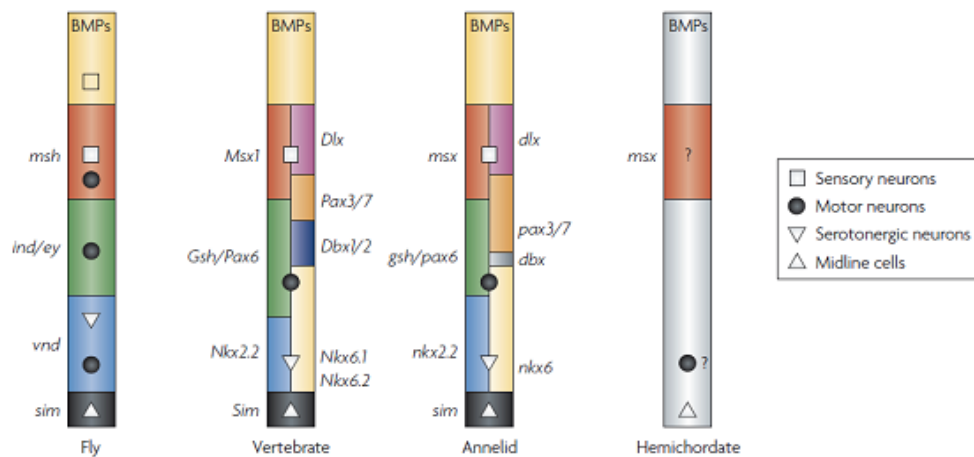


Figure 33 : Profil d'expression des gènes marquant la régionalisation médio-latérale chez la drosophile, les vertébrés, les annélides et les hémichordés, et identité neuronale. Ce sont les annélides et les vertébrés qui présentent le plus de similitudes dans le profil d'expression de leurs gènes columnaires. On remarque que ce profil d'expression est absent chez les hémichordés. *dbx*, developing brain homeobox; *dlx*, distal-less homeobox; *ey*, eyeless; *gsh*, genomic screen homeobox; *ind*, intermediate neuroblasts defective; *msh*, muscle segment homeobox; *msx*, muscle segment homeobox; *nkx*, NK transcription factor-related; *pax*, paired box; *sim*, single-minded; *vnd*, ventral nervous system defective. (Mizutani & Bier, 2008)

De manière générale, les mécanismes de régionalisation médio-latérale et dorso-ventrale présentent de fortes similitudes entre les vertébrés, ecdysozoaires et lophotrochozoaires annélides. La régionalisation dépend de l'activation dorsale de la voie BMP et de l'activation ventrale de la voie Shh chez les vertébrés ou Sog chez les insectes. Cependant, des différences concernant l'expression et l'implication de certains gènes de régionalisation ou la genèse pas toujours similaire des sous-types neuronaux associés aux différentes colonnes posent une fois encore la question de l'organisation ancestrale et des mécanismes régissant la mise en place du SN de Urbilateria.

Chez les mollusques, une étude a notamment cherché à discriminer les neurones somatiques sensoriels (expriment *brn3*), des neurones somatiques moteurs (expriment *lhx3/4* et *mnx*) et les neurones viscéraux moteurs et sensoriels (expriment *phox2*) (Nomaksteinsky et al., 2013). Chez la larve d'*Haliothis asinina*, les marqueurs sensoriels sont retrouvés au niveau de zones ectodermiques, suggérant qu'il s'agit de structures sensorielles périphériques. Chez l'aplysie, *brn3* s'exprime dans les ganglions pleuraux, cérébraux et abdominaux dans des zones *SensorinA+*, neuropeptide spécifique de cellules sensorielles. Concernant les marqueurs viscéraux, *phox2* s'exprime dans le ganglion abdominal à fonction majoritairement viscérale chez l'aplysie, et dans les ganglions viscéraux de la Lymnée. Chez la Lymnée les ganglions pédieux expriment *lhx3/4* et *mnx*, suggérant la présence de neurones somatiques moteurs. **Chez *S. officinalis***, l'étude de *phox2* a révélé la présence de neurones apparemment viscéraux au niveau des ganglions stellaires, des motoneurons du manteau et au niveau de l'axone qui contrôle entre autre l'éjection de l'eau et permet les mouvements très rapides des coléoides. Ce dernier point est extrêmement intéressant d'un point de vue évolutif. En effet, s'il est fort probable que la fonction du manteau des mollusques était ancestralement exclusivement viscérale, chez les coléoides une fonction locomotrice s'est rajoutée et s'illustre par des mécanismes d'innervations nerveuses spécifiques. Par exemple, le mode de conduction rapide des potentiels d'actions *via* les ganglions stellaires et les nerfs géants. Il semble néanmoins que le système nerveux associé au manteau présente des marqueurs viscéraux et non pas somatiques, davantage liés aux fonctions ancestrales que dérivées. Cela est étonnant car les propriétés du système nerveux viscéral ne sont pas les mêmes que celui du système nerveux somatique du moins chez les vertébrés, ne serait-ce que par la cinétique et la fréquence de conduction des potentiels d'actions.

Ainsi il semblerait que les « codes transcriptionnels » des neurones somatiques et viscéraux présentent de fortes similitudes entre les mollusques et les vertébrés.

IV Différenciation neurale

La différenciation neurale correspond à l'étape finale de la neurogenèse permettant à une cellule, jusque-là indifférenciée, de devenir soit une cellule gliale soit un neurone par l'intermédiaire d'une série de divisions asymétriques. Celle-ci dépend de la répartition non homogène de certains facteurs dans les NPCs.

Les protéines de liaison à l'ARN (RNA binding proteins ou RBP) jouent un rôle essentiel au cours de cette différenciation neurale. Comme leur nom l'indique, ces protéines se lient sur les ARN messagers et permettent une régulation active de la transcription. Elles sont capables notamment d'accélérer ou de ralentir leur dégradation ainsi que de contrôler la traduction et la localisation d'un grand nombre de protéines (Pascale et al., 2008 ; Kerner et al., 2011).

Parmi ces protéines, celles de la famille Elav (Embryonic Lethal Abnormal Visual system) sont d'importants régulateurs de cette étape de la différenciation neurale, depuis la sortie du cycle cellulaire jusqu'à l'établissement des connexions synaptiques. Chez l'ensemble des bilatériens, les gènes *elav/hu* sont exprimés dans les cellules neurales. Chez les vertébrés, il a été mis en évidence des profils d'expression où les gènes *hu* sont exprimés dans les progéniteurs neuraux et dans les neurones en différenciation (Wakamatsu & Weston, 1997 ; Perron et al., 1999 ; Park et al., 2000). Les protéines qu'ils codent se lient aux ARNm de plusieurs acteurs de la neurogenèse, notamment au régulateur post-transcriptionnel *musashi-1* qui participe à la transition entre prolifération et différenciation chez les NPCs. Il a également été mis en évidence des liaisons avec plusieurs régulateurs du cytosquelette, des déterminants de la croissance des neurites et de la formation des synapses (Okano & Darnell, 1997 ; Ratti et al., 2006 ; Pascale et al., 2008). Chez la drosophile, le gène *elav* est cependant exprimé dans l'ensemble des cellules neurales, même au niveau des neuroblastes en prolifération et des cellules gliales (Robinow & White, 1991 ; Berger et al., 2007). Chez les lophotrochozoaires, (aplysie : Yim et al., 2006 ; Platynereis : Denes et al., 2007 ; Capitella : Meyer & Seaver, 2009), *elav* est exprimé dans les neurones post-mitotiques en différenciation. Chez l'annélide *Platynereis dumerilii*, *Pdu-elav* s'exprime également dans une partie des progéniteurs neuraux prolifératifs (Denes et al., 2007 ; Simionato et al., 2008).

Ces données suggèrent donc un rôle important des protéines Elav dans les étapes de la différenciation neuronale. Notons également que de nombreux autres facteurs de transcriptions

sont impliqués dans ces mécanismes de différenciation. Parmi ces facteurs, on retrouve les gènes bHLH proneuraux comme la *neurogénine* (*ngn*) et *neuro D* (Neurogenic Differentiation). Ces gènes fonctionnent comme des régulateurs positifs de la neurogenèse. L'expression de *Ngnr1* chez le xénope est localisée au niveau du territoire présomptif des neurones primaires (Ma et al., 1996 ; Bellefroid et al., 1996 ; Perron et al., 1999). Son expression est capable d'induire l'expression en cascade de nombreux gènes impliqués dans la détermination neuronale mais aussi d'autres facteurs impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (Ohnuma & Harris, 2003). Activé par *ngnr1*, *neuroD* est le médiateur majeur de l'activité *Ngnr*. Une étude a permis d'identifier les gènes cibles directes des facteurs *ngnr1* et *neuroD* (Seo et al., 2007). Ces gènes codent des régulateurs de la transcription, des protéines de transduction du signal, des protéines impliquées dans le réarrangement du cytosquelette lors de la différenciation et la migration cellulaire ainsi que d'autres protéines dont les rôles sont inconnus et restent à déterminer (Lee et al., 1995 ; Dubois et al., 1998 ; Pozzoli et al., 2001 ; Bellefroid et al., 1996 ; Henningfeld et al., 2007).

Chez les mollusques, les processus de différenciation neurale restent mal connus. Néanmoins de nombreuses études portent sur la spécification fonctionnelle et l'expression de neurotransmetteurs chez les gastropodes (Croll, 2000) scaphopodes (Wanninger, 2008), monoplacophores (Voronezhskaya et al., 2002) et céphalopodes (Wollensen et al., 2010a, 2010b ; Aroua et al., 2011 ; Baratte & Bonnaud, 2009 ; Wollensen et al., 2012). Chez *S. officinalis*, la plupart des ganglions et structures sensorielles contiennent des neurones différenciés dès le début de l'organogenèse. Ces travaux nous apportent déjà une vision d'un système comportant des cellules fonctionnelles. **Cependant, aucune étude de la dynamique de différenciation des neuroblastes au cours du développement n'a été menée chez un mollusque jusqu'à présent.**

PROBLEMATIQUES DE THESE

Le contexte général de mon travail de thèse décrit dans l'introduction est le suivant :

- Jusqu'à récemment, les études des mécanismes régissant la neurogenèse chez les bilatériens ont surtout été menées chez des espèces métamérisées présentant des organisations nerveuses axiales médianes. Ces études ont révélé que des gènes homologues sont impliqués dans la mise en place du système nerveux. Les profils d'expression des gènes de spécification neurale le long des axes antéro-postérieur et médio-latéral présentent notamment de nombreuses similitudes chez des espèces éloignées phylogénétiquement : souris vertébré, drosophile ecdysozoaire et annélide lophotrochozoaire. Les similitudes d'organisations nerveuses et de profils moléculaires ont conduit à l'élaboration d'hypothèses évolutives soutenant l'homologie de ces systèmes : Urbilateria aurait présenté un système nerveux centralisé, dont la régionalisation était régie par les formes ancestrales des gènes actuels.
- Des études portant sur des organismes à l'organisation nerveuse différente tels que les hémichordés laissent apparaître que ces similitudes ne sont plus forcément retrouvées dès lors que nous sortons du cadre de ces systèmes nerveux délimités. Les similitudes observées pourraient alors être le fruit de recrutement de mêmes gènes dans la genèse de structures convergentes, davantage lié à des rôles fonctionnels équivalents et à des contraintes de formes.

Afin d'enrichir les données qui nous permettraient de discuter ce débat sur l'homologie, ma thèse s'inscrit dans le cadre de l'étude de la neurogenèse chez *S. officinalis*, mollusque céphalopode qui ne présente pas de système axial médian tout en possédant une centralisation et une cérébralisation poussée de son système nerveux, issus d'un neuroectoderme discontinu. Ces caractéristiques en font des animaux d'intérêt indéniable dans le cadre des études Evo-dévo du SN.

- Le but majeur de mon travail de thèse a été de déterminer si des mécanismes de régionalisation médio-latérale et antéro-postérieure existent chez la seiche (et donc chez les céphalopodes). Outre nous apporter des éléments supplémentaires de réponse sur l'évolution de la centralisation du SN, cette recherche s'inscrit dans le cadre de la

question générale d'orientation des mollusques. L'absence d'un système axial médian de type cordon nerveux ne nous permet pas d'établir une délimitation claire antéro-postérieure et dorso-ventrale comme chez les vertébrés, insectes et annélides. L'embryon fait l'objet de profonds changements morphologiques, rendant son orientation et celle de l'adulte difficile à appréhender. Ces études peuvent-elles nous aider à appréhender l'orientation embryonnaire ? Existe-t-il des gènes d'antériorité, de ventre, de dos ? Retrouvons nous des profils de régionalisation antéro-postérieure et médio-latérale ?

- Un autre aspect de mon travail fut de tenter de comprendre la dynamique de différenciation du SN de la seiche. Émergeant à partir de territoires nerveux épars, le système ganglionnaire discontinu constitue une différence majeure avec les autres espèces conventionnellement étudiées. Existe-t-il un profil de maturation des différents ganglions chronologiquement temporalisé ? Si oui, peut-il nous apporter des éléments de réponse sur les spécificités de développement du SN des céphalopodes et sur la dynamique de mise en place du cerveau ? En effet, en plus de nous renseigner sur le développement spécifique de *S. officinalis*, ces études pourraient nous éclairer sur la neurogenèse des mollusques mais également sur l'émergence de caractères dans un groupe phylogénétique donné et sur les phénomènes de convergences évolutives (notamment par rapport au cerveau des céphalopodes, différent de celui des autres mollusques et convergent avec celui des vertébrés).

La démarche scientifique menée pour répondre à ces questions se base essentiellement sur la caractérisation de gènes candidats chez la seiche, connus pour intervenir dans les processus de régionalisation et de différenciation nerveuse chez les vertébrés, les insectes et les annélides, et sur l'étude de leur expression durant le développement de *S. officinalis*.

PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1 :

DYNAMIQUE DE DIFFERENCIATION NEURALE CHEZ *SEPIA OFFICINALIS*

La connaissance du développement du système nerveux des céphalopodes se base essentiellement sur des études histologiques. Les techniques de colorations utilisées (hématoxyline, bleu de toluidine, nitrate d'argent) ont montré que les territoires gangliogéniques (accumulation des neuroblastes) émergent tous simultanément autour des stades 15-16 (*Octopus vulgaris* : Marquis, 1989 ; *Sepioteuthis lessoniana* : Shigeno et al., 2001 ; *Idiosepius paradoxus* : Yamamoto et al., 2003). En plus de ces études histologiques, la localisation de neurotransmetteurs a permis de visualiser le développement neuronal des céphalopodes, mettant en évidence des cellules fonctionnelles et déjà spécialisées dès le début de l'organogenèse (*Idiosepius paradoxus* : 5-HT, Wollensen et al., 2010a ; FMRF, Wollensen et al., 2010b. *S. officinalis* : FMRF, Aroua et al., 2011 ; tyrosine hydroxylase, Baratte & Bonnaud, 2009 ; *Octopus vulgaris* et *Argonauta hians*: 5HT, FMRF, Wollensen et al., 2012). Les premières cellules à FMRFs apparaissent à partir du stade 19 chez *Idiosepius paradoxus* (Wollensen et al., 2010), et à partir du stade 17 chez *S. officinalis* dans les ganglions viscéraux (Aroua et al., 2011). Chez *S. officinalis*, l'étude de la tyrosine hydroxylase TH a notamment montré que la plupart des ganglions et structures sensorielles contiennent des neurones différenciés et dopaminergiques dès le début de l'organogenèse (stade 16) (Baratte & Bonnaud, 2009). Bien que les ganglions apparaissent simultanément, ces études ont démontré une disparité des profils de maturation spatio-temporelle dans les différents territoires nerveux, avec des différences d'identité neuronale au sein même des ganglions.

Ces travaux nous renseignent sur des processus de spécialisations neuronales relativement tardifs durant l'organogenèse. Ils ne nous informent pas sur les étapes d'émergence et de différenciation des NPCs, et nous apportent une vision d'un système nerveux déjà fonctionnel. En fait, très peu d'études ont été menées pour décrire les processus d'internalisation, de sortie de cycle cellulaire des progéniteurs neuraux, et d'entrée en différenciation. De ce fait, les mécanismes génétiques de la dynamique de neurogenèse restent mal connus. Une étude menée

chez *Nautilus pompilius* et *Idiosepius paradoxus* et utilisant un anticorps contre la protéine Distalless a permis de mettre en évidence pour la première fois des territoires proneuraux chez les céphalopodes (Shigeno et al., 2008). D'autres études menées sur les gènes de développement tels que *shh* (Navet et al., 2009), *engrailed* (Baratte et al., 2007), *apterous* (Farfan et al., 2009) n'ont pas permis de révéler des territoires neurogéniques. Or l'intégration des étapes de la neurogenèse précoce constitue certainement un point clé pour comprendre les spécificités des céphalopodes par rapport aux autres mollusques, ou à d'autres métazoaires. En effet, si les territoires gangliogéniques apparaissent visuellement aux stades 15-16, nous ignorons quand les cellules qui les constituent entrent en différenciation. Si certaines de ces cellules ganglionnaires restent à l'état de cellules progénitrices (de types cellules souches, avec un fort potentiel mitotique), leur division pourrait aussi expliquer l'importance relative de certains ganglions (puis lobes) par rapport à d'autres (Partie I Chapitre 2). De plus, le terme de ganglion est couramment employé pour désigner les structures nerveuses au cours du développement des céphalopodes, mais la présence de cellules nerveuses fonctionnelles n'a pas été démontrée (ce qui est un pré-requis pour pouvoir les qualifier de « ganglions »). La comparaison de la dynamique d'entrée en différenciation et de sortie de cycle cellulaire des différents territoires nerveux m'a donc semblé être un point d'étude essentiel.

Après avoir recherché au sein de la banque ESTs générée au laboratoire (Bassaglia et al., 2012) des orthologues de gènes neurogéniques, je me suis intéressée à la famille des protéines de liaison à l'ARN (RNA binding proteins ou RBP), impliquées très largement chez les métazoaires dans les étapes de sélection et de différenciation des précurseurs neuraux (Partie I Chapitre 3). En se liant de façon spécifique à certains ARNm, elles sont en effet capables d'accélérer ou de ralentir leur dégradation comme leur traduction. Une multitude de RBP sont présentes dans les cellules progénitrices neurales et dans les neurones différenciés ou en cours de différenciation. Parmi les gènes qui codent ces protéines, ceux de la famille *elav/hu* (embryonic lethal abnormal visual system) sont exprimés chez l'ensemble des bilatériens et sont des marqueurs précoces des cellules neurales qui viennent de quitter le cycle cellulaire et commencent à se différencier en neurones. Le gène *musashi*, quant à lui, participe à la transition entre prolifération et différenciation des cellules progénitrices.

I Etude de l'expression du gène *Sof-elav1*

(Article n°1, Article n°3)

Les gènes de la famille Elav sont définis par la présence de deux motifs de reconnaissance ARN (RRM1-2) suivi par une région charnière (RRM3) (Yim et al., 2006 ; Samsom, 2008). Chez les métazoaires les membres de cette famille présentent des séquences très conservées, et les différents orthologues (3 chez la drosophile, 4 chez les vertébrés) sont impliqués dans de nombreux processus développementaux. Les gènes *elav1/hu* sont principalement exprimés dans les cellules neurales qui viennent de quitter le cycle cellulaire et commencent à se différencier en neurones (Sakakibara & Okano, 1997). Ces expressions sont observées chez la drosophile (Campos et al., 1985 ; Robinow & White, 1991 ; Berger et al., 2007), chez les vertébrés *Mus musculus* (Sakakibara et al., 1996 ; Akamatsu et al., 1999), *Gallus gallus* (Wakamatsu & Weston, 1997), *Danio rerio* (Kim et al., 1996), *Xenopus* (Park et al., 2000), *Amphioxus* (Sato et al., 2001), chez le cnidaire *Nematostella* (Marlow et al., 2009 ; Miller & Technau, 2010), et chez les lophotrochozoaires *Platynereis* (Denes et al., 2007) et *Capitella* (Meyer & Seaver, 2009).

La recherche des gènes *elav* et l'étude de leurs expressions au cours du développement ont été conduites chez *S. officinalis*. Les résultats obtenus constituent la première description spatio-temporelle de ce gène chez un mollusque, et ont fait l'objet d'une publication (Article n°1). Cet article se concentre essentiellement sur les résultats concernant les territoires nerveux centraux. Un autre article en préparation se concentre sur les cellules périphériques (et vraisemblablement sensorielles) (Article n°3).

Caractérisation de deux homologues d'*elav* chez *S. officinalis*

La recherche de gènes candidats dans la banque ESTs d'embryon de *S. officinalis* (Bassaglia et al., 2012) a révélé la présence de deux homologues potentiels d'*elav/hu*, nommés *Sof-elav1* et *Sof-elav2*. Les deux motifs de reconnaissance ARN (RRM1-2) sont conservés (Fig. 2A article n°1). Deux orthologues avaient également été retrouvés chez le mollusque *Aplysia* (Yim et al., 2006) et l'annélide *Capitella sp.* (Meyer & Seaver, 2009). *Sof-elav2* semble être une forme spécifique au groupe des lophotrochozoaires (Meyer & Seaver, 2009) (Fig. 2B article n°1), et son expression n'est pas spécifique au système nerveux. Chez l'annélide *Capitella sp.*, *CapI-elav2* s'exprime majoritairement dans des précurseurs mésodermiques (Meyer & Seaver, 2009).

D'une même manière, nous avons mis en évidence que l'expression de *Sof-elav2* n'est pas restreinte au SN chez l'embryon de seiche, mais les couches cellulaires concernées restent à déterminer. *Sof-elav1* est homologue de la forme retrouvée chez tous les groupes de bilatériens (Fig. 2B article n°1), connue pour son rôle spécifique dans la neurogenèse. Les résultats présentés concernent ce gène.

Sof-elav1* est un marqueur spécifique du système nerveux chez *S. officinalis

Les hybridations *in situ* ont révélé que *Sof-elav1* s'exprime exclusivement au niveau des structures nerveuses centrales et périphériques:

- Les ganglions qui constitueront le cerveau du juvénile, à savoir les ganglions pédieux (future masse sous-œsophagienne antérieure et médiane), les ganglions viscéraux, (future masse sous-œsophagienne postérieure), et les ganglions cérébraux (future masse supra-œsophagienne) ;
- Les ganglions centraux optiques ;
- Les ganglions périphériques avec les ganglions stellaires situés dans le manteau, les ganglions intrabrachiaux, et les ganglions branchiaux à la base des branchies ;
- Les organes olfactifs ;
- Les lignes latérales qui émergent à la surface des piliers des bras en développement et qui s'étendent le long des bras (hormis le bras 5) ;
- Les cellules ectodermiques sensorielles ;
- Quelques cellules dans le tissu céphalique précoce.

A partir du stade 23, *Sof-elav1* s'exprime dans tous les ganglions, ce qui permet de constituer une première cartographie complète du SN de l'embryon de seiche.

Grâce à ce gène nous pouvons confirmer la localisation de ces ganglions, jusque-là déduite d'observations histologiques d'autres céphalopodes (Yamamoto et al., 2003). Si la localisation de cellules nerveuses dans les territoires présomptifs a été établie précédemment (Shigeno et al., 2008 ; Baratte & Bonnaud, 2009 ; Buresi et al., 2012), l'expression de *Sof-elav1* permet pour la première fois de déterminer l'ensemble des territoires neurogéniques. *Sof-*

elav1 constitue le premier marqueur génique du SN en développement décrit chez un mollusque.

L'expression de *Sof-elav1* n'est pas simultanée dans tous les ganglions

Dès le stade 16, les territoires présomptifs des différents ganglions sont déjà répartis sur l'embryon. La plupart d'entre eux sont de légers épaissements ectodermiques présentant un faible niveau d'expression de *Sof-elav1* (Fig. 3B, 4A, 8A, D article n°1). Ce marquage très léger est sans comparaison avec la coloration intense relevée dans les ganglions viscéraux dès le début de l'organogenèse (Fig. 3B, C article n°1). Ainsi, globalement tous les ganglions semblent comporter quelques cellules *elav+* dès le stade 16. Cependant, nous estimons que les ganglions sont *elav+* lorsqu'une majorité de leurs cellules expriment *Sof-elav1*, de manière similaire à celle notée au niveau des ganglions viscéraux au stade 16.

Voici la chronologie de l'expression de *Sof-elav1* :

Les ganglions viscéraux (future masse sous-œsophagienne postérieure) sont les premiers à exprimer *Sof-elav1* dès le début de l'organogenèse lorsque les territoires présomptifs des ganglions émergent, avant le stade 16 (Fig. 3 article n°1). Les ganglions stellaires expriment *Sof-elav1* à partir du stade 18 (Fig. 6 article n°1). Les ganglions pédieux (future masse sous-œsophagienne antérieure et médiane) expriment *Sof-elav1* à partir du stade 20 (Fig. 4B article n°1), suivis des ganglions intrabrachiaux au début du stade 22, (Fig. 7 article n°1). Les ganglions optiques expriment *Sof-elav1* au stade 22 (Fig. 5 article n°1), ainsi que les ganglions cardiaques (Fig. 8 article n°1). Enfin, les ganglions cérébraux (future masse supra-œsophagienne) sont les derniers à exprimer *Sof-elav1*, entre la fin du stade 22 et le début du stade 23.

Au niveau des structures sensorielles, les organes olfactifs expriment *Sof-elav1* dès le début de l'organogenèse au stade 16. Les lignes latérales expriment *Sof-elav1* sur le bras 2, 4 puis 3 au cours du stade 24 et sur le bras 1 à partir du stade 25 (**Fig. 34**). Enfin les cellules sensorielles de la peau expriment *Sof-elav1* aux alentours des stades 24-25 avec : les cellules du bord du manteau au stade 24, puis toute la surface de l'épiderme du manteau au stade 25 ; sur la tête au niveau des piliers des bras à partir du stade 24, qui finissent par recouvrir la tête de l'embryon (Article n°3).

Le tissu céphalique précoce exprime également *Sof-elav1* vers le stade 25, ce qui sous-entend probablement la présence de cellules nerveuses dans cette structure peu décrite qui sera recouverte par les piliers des bras (**Fig. 34 b'**).

Le gène *elav1* est connu pour s'exprimer au niveau des NPCs. Cette expression traduit l'arrêt des mitoses et l'entrée dans une phase de différenciation neuronale. La détection de *Sof-elav1* au niveau des ganglions révèle certainement la présence de NPCs tout juste sorties du cycle cellulaire. ***Sof-elav1* nous renseigne donc directement sur la cinétique de différenciation du SN et du système sensoriel de *S. officinalis*.** Pour la première fois chez un mollusque nous pouvons appréhender la dynamique de différenciation des neuroblastes.

Cette étude nous permet désormais d'adopter une terminologie nerveuse qui a un sens du point de vue moléculaire. Lorsque les territoires nerveux sont présents mais n'expriment pas, ou très légèrement *Sof-elav1*, nous adopterons le terme de territoires présomptifs nerveux. A partir du moment où *Sof-elav1* s'exprime dans une majorité de cellules, nous emploierons le terme de ganglions. Ainsi, à partir du stade 23, nous pouvons définitivement parler de ganglions pour tous les territoires nerveux. Ces ganglions continuent ensuite leur maturation. Certains finiront par se condenser et par fusionner pour former des masses chez les céphalopodes, elles-mêmes constituées de lobes fonctionnellement hiérarchisés. La chronologie de différenciation est résumée dans la **figure 35**.

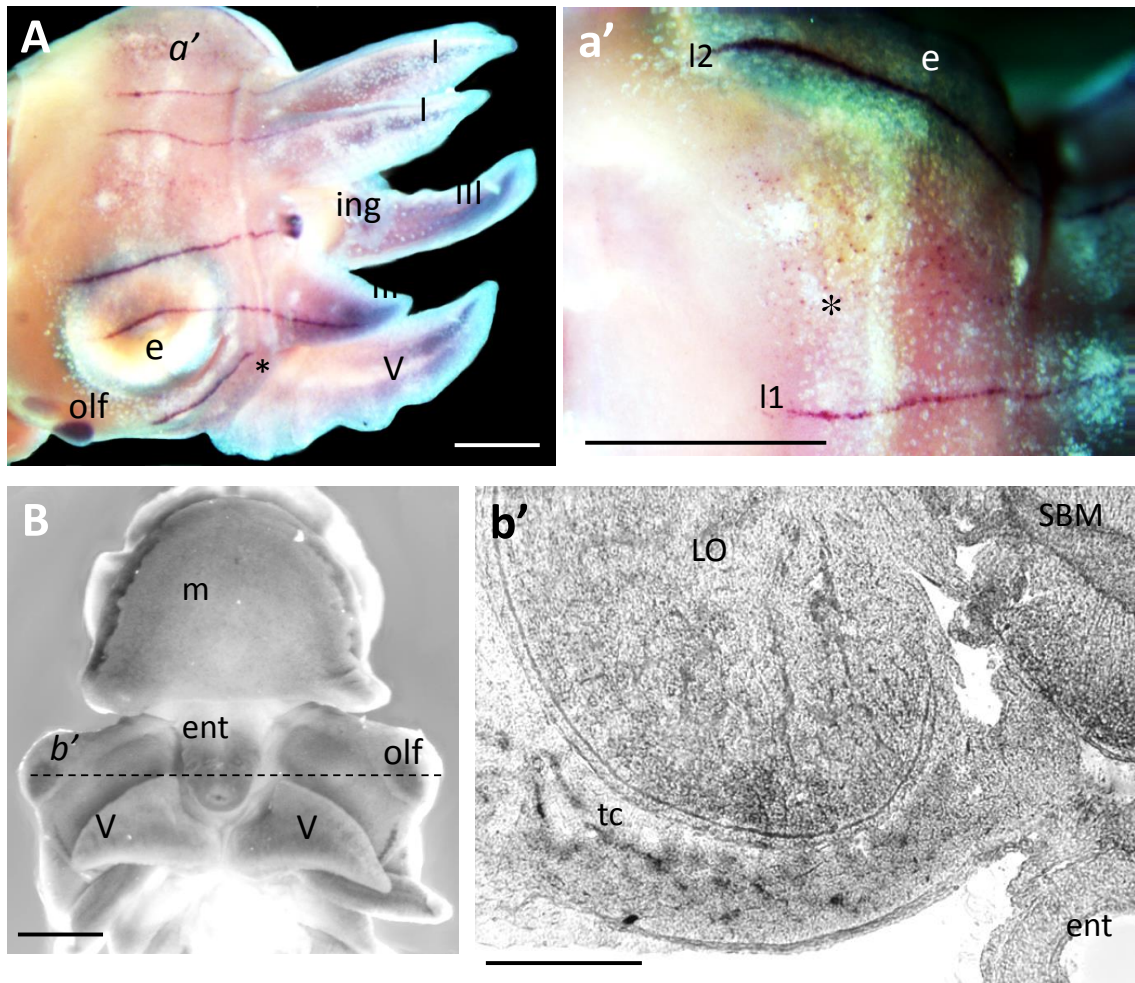


Figure 34 : Expression de *Sof-elav1* dans des structures sensorielles et dans le tissu céphalique précoce chez l'embryon de seiche. A- Tête d'un embryon au stade 27. Les organes olfactifs (ol) et les lignes latérales expriment *Sof-elav1*. Le bras II droit sectionné sur la photo permet de visualiser les ganglions intrabrachiaux (ing). **a'**- Grossissement de la zone indiquée en A. Visualisation des cellules épidermiques sensorielles (astérisque) et des lignes latérales 1 (l1) et 2 (l2). **B-** Embryon stade 25 face physiologique ventrale, les organes olfactifs, les cellules sensorielles du manteau et les lignes latérales expriment *Sof-elav1*. Une section transversale indiquée par les pointillés est présentée en **b'**- le tissu céphalique présente des cellules *elav+*. **I à V** : bras ; **e** : œil ; **ent** : entonnoir ; **LO** : lobe optique ; **m** : manteau ; **olf** : organe olfactif ; **SBM** : masse sous œsophagienne ; **tc** : tissu céphalique précoce. Echelle : 200µm.

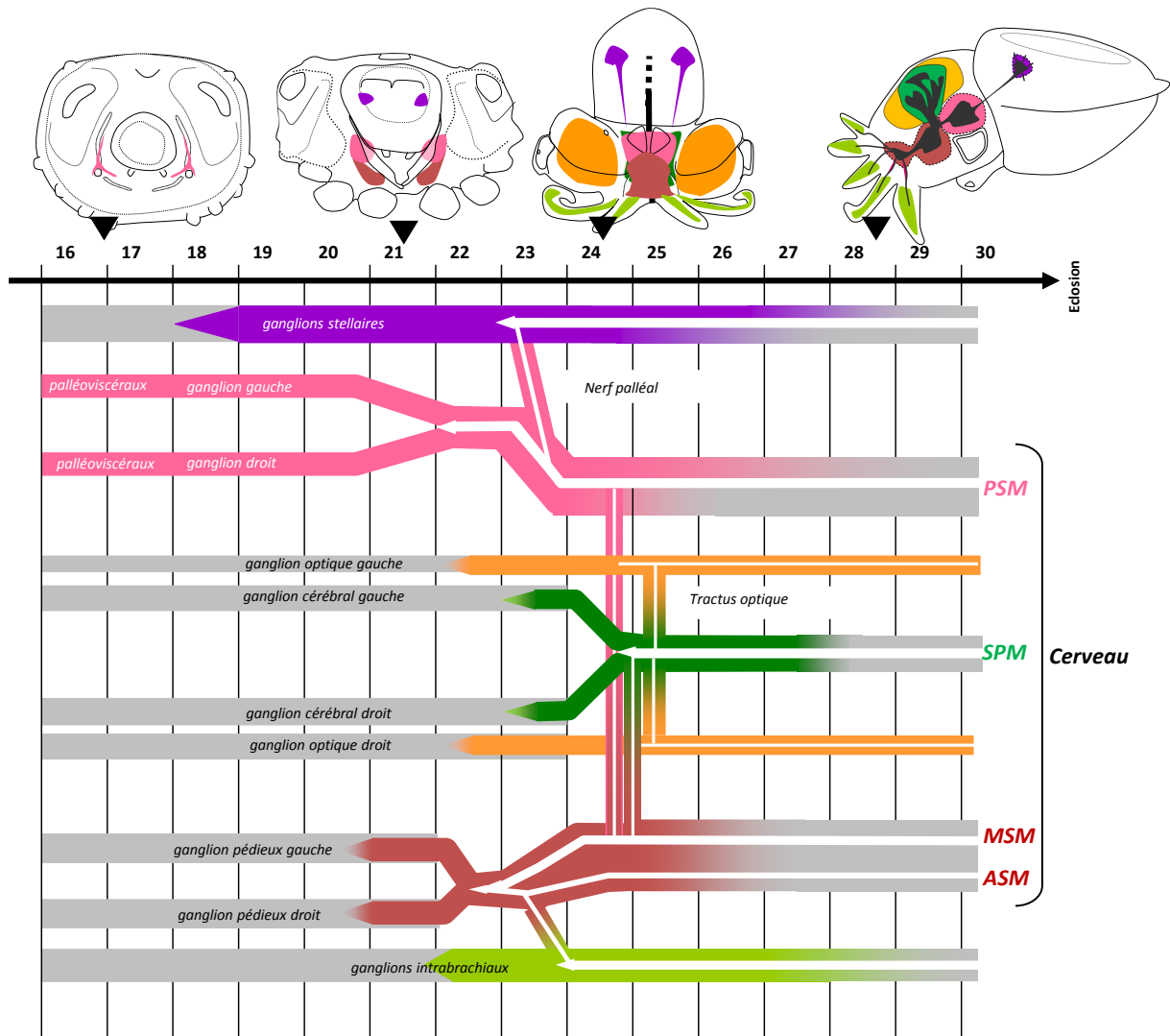


Figure 35 : Cinétique de différenciation ganglionnaire déduite de l'expression spatio-temporelle de *Sof-elav1* durant l'organogenèse de *S. officinalis*. Les ganglions/masses sont illustrés par des barres horizontales, grisées lorsque les zones sont *elav*-, colorées lorsqu'une majorité de cellules sont *elav*+. Les barres blanches à l'intérieur des ganglions et masses illustrent le neuropile. Les barres reliant les ganglions illustrent la connexion des ganglions. **ASM** : masse sous-œsophagienne antérieure ; **MSM** : masse sous-œsophagienne médiane ; **PSM** : masse sous-œsophagienne postérieure ; **SPM** : masse supra-œsophagienne.

Une interprétation évolutive : une différenciation tardive des ganglions cérébraux peut-elle expliquer l'importance en taille de la masse supra-œsophagienne chez les céphalopodes ?

Au niveau des ganglions composant le cerveau, les ganglions viscéraux sont donc les premiers à présenter des NPCs en différenciation au stade 16, suivis des ganglions pédieux au début du stade 22. Les ganglions cérébraux sont les derniers à présenter une quantité notable de cellules progénitrices exprimant *Sof-elav1* (à la fin du stade 22). Aucune étude du gène *elav* n'a été réalisée chez d'autres mollusques. Néanmoins chez les larves véligères d'*Haliotis* et de l'*Aplysie*, les ganglions cérébraux sont les premiers à exprimer des neurotransmetteurs (Hinman et al., 2003 ; Dickinson et al., 2000), concomitamment aux ganglions pédieux et/ou viscéraux. La différenciation tardive des ganglions cérébraux semble donc être une spécificité des céphalopodes.

Dans la mesure où l'expression de *Sof-elav1* marque l'entrée en différenciation des NPC, une expression retardée de *Sof-elav1* dans un ganglion signifie que la plupart de ses cellules reste dans un état de non différenciation et conserve leurs capacités mitotiques. Même si une étude plus précise sur les capacités mitotiques au sein des différents ganglions doit être menée, nous pensons que cette différenciation retardée des ganglions cérébraux qui semble spécifique aux céphalopodes pourrait expliquer la proportion relative plus importante de la masse supra-œsophagienne (la SPM, issue des ganglions cérébraux) par rapport aux autres lobes du cerveau (Partie I Chapitre 2). Chez l'octopus adulte, les nombres de neurones des lobes optiques ainsi que ceux de la SPM issus des ganglions cérébraux sont estimés à environ 130 000 000 et 37 300 000 respectivement, contre 2 500 pour la SBM (Young, 1963). De tels chiffres ne seraient donc possibles que si des cellules progénitrices sont maintenues en permanence dans un état indifférencié avec des capacités mitotiques fortes. Nos résultats avec le gène *Sof-elav1* constituent donc une première étape dans la compréhension de la spécificité des céphalopodes et de leur cerveau.

Si les principaux traits de l'organisation anatomique du cerveau des céphalopodes sont acquis avant la naissance, les différents lobes font face à des changements morphologiques drastiques après l'éclosion. Le complexe du lobe vertical notamment, (composant de la SPM dérivant des ganglions cérébraux) assez restreint chez l'embryon, passe de 7% du volume total du cerveau à l'éclosion à 12% chez les juvéniles de quelques mois (Frösch, 1971). La masse supra-œsophagienne constitue le centre de l'apprentissage et de la mémorisation chez les céphalopodes (Messenger, 1973), et il a été montré que chez les juvéniles, les capacités de

mémorisation augmentent pendant le développement post-embryonnaire précoce et tardif (Dickel et al., 1997, 1998). Or la structure essentiellement impliquée dans ces processus est le lobe vertical, composant de la SPM (Messenger, 1973). Ces modifications dans l'organisation du cerveau sont à relier, en plus d'une détermination génétique, au changement d'environnement faisant suite à l'éclosion. Les conditions environnementales perçues à l'extérieur de la capsule sont différentes. Même si des études ont mis en évidence une perception de l'environnement extérieur par l'embryon (Romagny et al., 2012), des paramètres tels que la gestion des courants marins, des prédateurs et du camouflage, le simple fait de se maintenir dans la colonne d'eau ainsi que la recherche de nourriture nécessitent une perception de ces changements et une adaptation de l'animal. La différenciation et la maturation tardive des ganglions cérébraux permettraient la prolongation d'une plasticité développementale post embryonnaire et par conséquent ces modifications morphologiques et ces grandes capacités d'apprentissage et d'adaptation.

Les différences de cinétiques de maturation des ganglions entre mollusques est certainement à relier à leurs différents modes de vie et modes de développement. Chez les mollusques qui présentent un développement indirect, la larve est très vite capable de percevoir et de réagir aux signaux environnementaux. La larve véligère d'*Haliotis*, par exemple, nage et se nourrit seulement 4 jours après la fécondation. Chez ces espèces, les ganglions cérébraux se différencient en premier. Chez les céphalopodes, l'embryon est protégé par sa capsule et se développe dans un environnement relativement stable. On peut donc faire l'hypothèse que le développement des ganglions cérébraux est retardé permettant ainsi une maturation prolongée, et des connexions synaptiques neuronales plus nombreuses à même de traiter des informations complexes. Ces spécificités développementales pourraient notamment nous éclairer sur le phénomène de convergence évolutive entre le cerveau des céphalopodes et des vertébrés. Eux aussi présentent un développement retardé suivi d'une grande plasticité neuronale post-natale, ce qui en fait des organismes aux capacités d'apprentissage et de mémorisation importantes.

La différenciation précoce des ganglions viscéraux et des organes olfactifs chez la seiche : des vestiges d'un état ancestral larvaire ?

Les céphalopodes ne présentent pas de stade larvaire, mais l'hypothèse la plus parcimonieuse tend à considérer que c'est le développement indirect qui constitue l'état

plésiomorphe (ancestral) du développement des mollusques, étant donné que les autres espèces présentent toutes au moins un stade larvaire. Les céphalopodes qui ont perdu les étapes de métamorphoses peuvent cependant présenter des vestiges de caractères ancestraux liés aux modes de développement indirect. Si l'expression de *Sof-elav1* tend à montrer des phénomènes de différenciations tardives chez l'embryon de seiche, différence notable avec les larves des mollusques à développement indirect, les organes olfactifs se différencient dès le début de l'organogenèse (déjà au stade 16), concomitamment aux ganglions viscéraux. Romagny et al. (2012) ont montré que l'embryon de seiche est capable de réagir à des stimuli chimiques et tactiles dès le stade 23. Ces capacités de perceptions sont certainement à relier aux organes olfactifs qui eux aussi se développent très tôt (Article n°3). Chez l'adulte d'*Octopus vulgaris*, plus de 1000 fibres nerveuses relient chaque organe olfactif au lobe olfactif associé, localisé entre les lobes optiques et le cerveau (Woodhams & Messenger, 1974; Boycott & Young, 1956). L'origine embryonnaire des lobes olfactifs est mal connue, il est donc possible que la maturation précoce des ganglions viscéraux soit impliquée dans ces capacités de perception. Ces différenciations précoces pourraient être considérées comme étant des vestiges d'un caractère « ancestral » lié à un type de développement indirect. L'absence de stade larvaire chez les céphalopodes et la durée de leur développement supérieure à celle des autres mollusques rendent la comparaison des étapes du développement et des expressions géniques délicates. Se baser sur la différenciation des systèmes sensoriels pourrait constituer une base comparative entre les stades embryonnaires des céphalopodes et les stades larvaires des autres mollusques.

II Etude de l'expression du gène *Sof-msi*

La famille des gènes *musashi* (*msi*) code des protéines de liaisons à l'ARN qui comportent deux motifs de reconnaissance ARN, RRM1 et RRM2. Ces protéines participent à la transition entre prolifération et différenciation des cellules progénitrices neurales (NPCs) en tant que régulateurs post-transcriptionnels chez les bilatériens, et s'expriment plus généralement dans les cellules souches des métazoaires. Une séquence protéique de type *musashi* a également été retrouvée chez le placozoaire *Trichoplax adhaerens*, qui ne dispose que de quatre types cellulaires, mais qui semble comporter une population de cellules multipotentes au niveau épithélial (Jakob et al., 2004). L'expression de *msi* dans des cellules souches est également retrouvée chez l'éponge *Ephydatia fluviatilis*, qui ne possède pas de SN, au niveau des archéocytes (Okamoto et al., 2012). Chez la drosophile, *d-msi* joue un rôle majeur dans les processus de divisions asymétriques des précurseurs d'organes sensoriels (SOPs) à l'origine des soies sensorielles, constituées de cellules nerveuses et non nerveuses issues de divisions asymétriques d'un SOP. *d-msi* est nécessaire à la mise en place des composantes nerveuse (neurones et cellules gliales) du SOP (Nakamura et al., 1994). De plus, *d-msi* s'exprime au niveau des cellules souches neurales, et joue un rôle dans le maintien de leur état indifférencié chez l'adulte (Siddall et al., 2006, 2012). Chez les lophotrochozoaires, une étude a été menée chez la planaire *Dugesia japonica* (Higuchi et al., 2008). Quatre orthologues ont été mis en évidence, et trois d'entre eux s'expriment spécifiquement dans des cellules neurales. Chez les vertébrés, les orthologues de *d-msi* (*musashi1* et *musashi2*) sont également connus pour s'exprimer dans les cellules souches/progénitrices neuronales : chez la souris (Sakakibara et al., 1996), le xénope (Richter et al., 1990), le poulet (Wilson et al., 2007), le poisson zèbre (Shibata et al., 2012), et chez les mammifères (Good et al., 1998 ; Okano et al., 2002 ; Okano et al., 2005 ; Gunter & McLaughlin, 2011). Chez l'embryon de souris, *m-msi* est retrouvé dans les précurseurs neuraux capables de générer des neurones et des cellules gliales, et persiste après la naissance dans des précurseurs neuronaux en prolifération dans certains territoires (Sakakibara & Okano, 1997). Une comparaison des expressions de *m-msi* et de *hu* (orthologue d'*elav*) chez la souris révèle qu'ils sont tout deux impliqués dans le développement des neurones et des cellules gliales et joueraient des rôles distincts dans les processus de neurogenèse (**Fig. 36**).

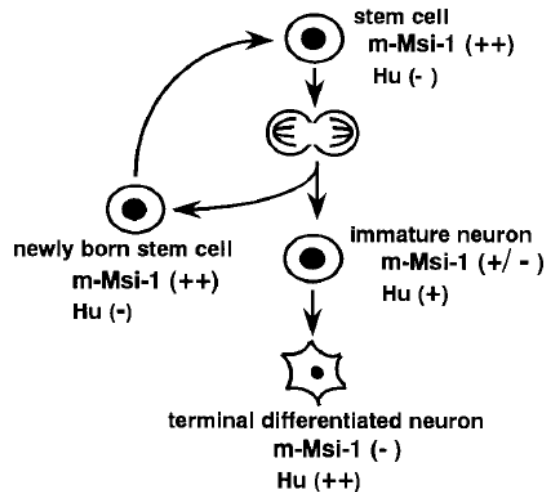


Figure 36 : Expression de *m-Msi* et *hu* durant les divisions cellulaires asymétriques des cellules souches du SNC durant la neurogenèse. *m-Msi* et *hu* s'expriment dans les précurseurs neuronaux et les neurones post-mitotiques respectivement. (D'après Sakakibara et al., 1996).

La recherche d'un orthologue de *musashi* et l'étude de son expression au cours du développement ont donc été conduites chez *S. officinalis*, avec dans l'idée de repérer les NPCs au sein des territoires gangliogéniques et d'évaluer leurs relations avec les cellules exprimant *Sof-elav1*. Les résultats obtenus sont préliminaires et ne portent pas sur tous les stades de développement. Ils constituent tout de même une première approche de l'expression de ce gène au cours du développement d'un mollusque.

Caractérisation d'un homologue de *musashi* chez *S. officinalis*

La recherche de gènes candidats dans la banque ESTs d'embryon de *S. officinalis* (Bassaglia et al., 2012) a révélé la présence d'un homologue potentiel de *musashi*, nommé *Sof-msi*. Le fragment contient un domaine de liaison à l'ARN (RRM) (annexe 7).

Durant la phase 1, *Sof-msi* ne s'exprime pas dans le système nerveux

Sof-msi s'exprime dans diverses structures au stade 18 (**Fig. 37 A-D**), à savoir :

- Les vésicules optiques ;
- La bouche ;
- Les tubes et poches de l'entonnoir ;
- Les statocystes ;
- Le bord du manteau et au niveau des territoires des nageoires ;

- Les branchies ;
- Les bras.

De façon surprenante, *Sof-msi* ne s'exprime pas au niveau des territoires gangliogéniques en début d'organogenèse, alors qu'il est présent dans de nombreuses autres structures. Si les gènes *musashi* sont connus essentiellement comme étant des marqueurs de cellules souches neurales, ils sont en réalité exprimés dans de nombreux types cellulaires. Chez les mammifères, les protéines Musashi-1 et Musashi-2 font partie des régulateurs ciblés dans les recherches de traitements oncologiques (Sutherland et al., 2013). De fortes expressions de *msi* ont par exemple été relevées au niveau de l'intestin de l'adulte de souris et de drosophile, probablement au niveau de cellules souches épithéliales (Okano et al., 2005 ; Siddall et al., 2006). *d-msi* est également exprimé dans les primordiaux des yeux composés de la drosophile (Hirota et al., 1999). Les protéines Msi sont également retrouvées dans les cellules hématopoïétiques, et dans les gonades (Gunter & McLaughlin, 2011). D'une même manière, ***Sof-msi* s'exprime probablement dans des cellules souches en prolifération dans divers tissus au début de l'organogenèse.**

L'absence d'expression dans le SN est-elle en lien avec le mode de division ?

D'après les études histologiques qui ont porté sur l'internalisation des NPCs chez l'aplysie, les divisions cellulaires de cette étape précoce de la neurogenèse semblent symétriques (pas de divisions asymétriques), contrairement à ce qui est généralement observé chez les autres non-vertébrés et chez les vertébrés, hors crête neurale (Jacob, 1984) (Partie I Chapitre 3). Or les gènes *msi* sont corrélés au mode de division asymétrique, notamment au niveau des précurseurs d'organes sensoriels (SOPs) de la drosophile (Nakamura et al., 1994). Il est possible que les placodes neurogéniques de l'embryon de seiche soient issues de divisions symétriques et non pas asymétriques, ce qui pourrait expliquer l'absence d'intervention du gène *musashi*. Une autre possibilité est que le gène *musashi* n'intervient tout simplement pas dans ces processus de divisions précoces des NPCs chez *S. officinalis*.

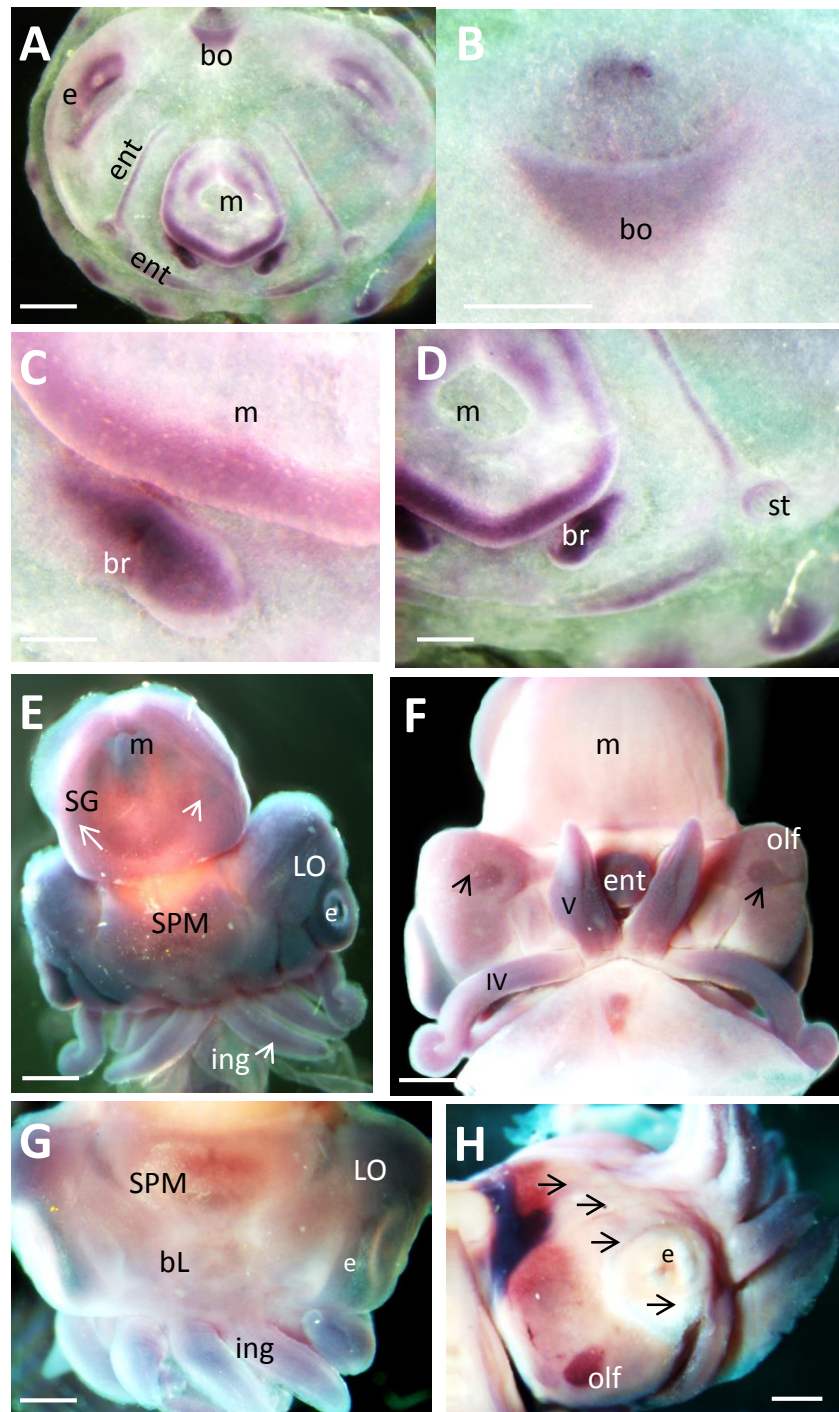


Figure 37 : Expression de *Sof-msi* au cours de l'organogénèse de *S. officinalis*. A-D : embryon au stade 18. E-F : embryon au stade 24. G : embryon au stade 26. H : embryon au stade 27. A : *Sof-msi* s'exprime dans de nombreuses régions de l'embryon, comme la bouche, les yeux et les bras. B-C-D : grossissement des régions de la bouche, des branchies, et d'une zone manteau-branchie-statocyste-entonnaior de l'embryon en A-. E-F : *Sof-msi* s'exprime dans la SPM, les lobes optiques, les ganglions stellaires (flèches blanches), les ganglions intrabrachiaux et les organes olfactifs (flèches noires). G : *Sof-msi* s'exprime clairement dans la SPM, les lobes optiques, les ganglions intrabrachiaux, le lobe buccal. H : *Sof-msi* s'exprime au niveau des lignes latérales (flèches noires) et des organes olfactifs. **bL** : lobe buccal ; **bo** : bouche ; **br** : branchies ; **e** : œil ; **ent** : entonnaior ; **ing** : ganglion intrabrachial ; **m** : manteau ; **olf** : organe olfactif ; **SG** : ganglion stellaire ; **SPM** : masse supra-césophagienne ; **st** : statocyste. Echelle :200µm

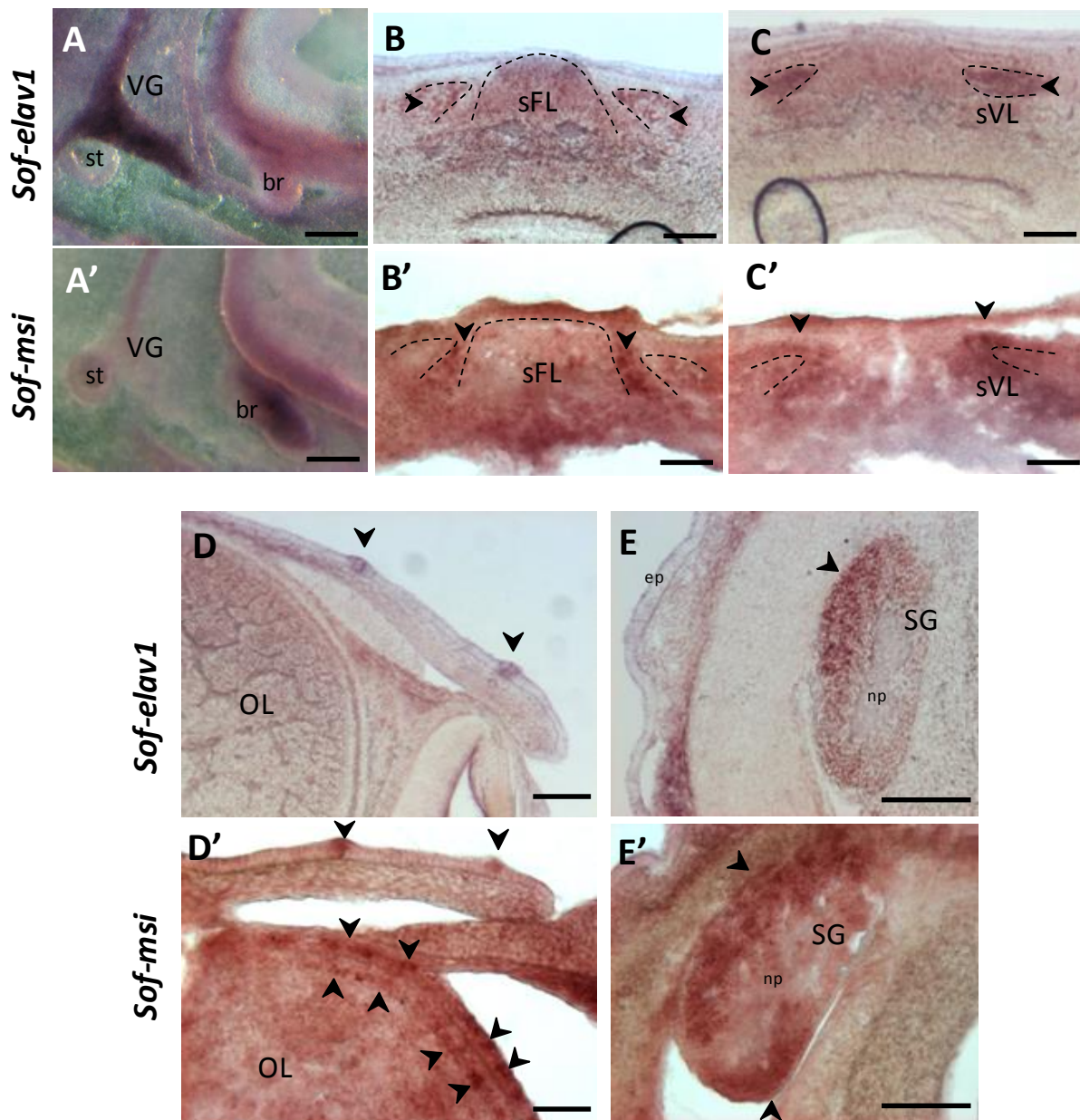


Figure 38 : Comparaison des expressions de *Sof-elav1* et *Sof-msi* au sein de différentes structures nerveuses. **A-A'**: ganglion palléoviscéral au stade 16, exprimant seulement *Sof-elav1* ; **B-B'**: sections transversales du lobe frontal supérieur au stade 25; **C-C'**: sections transversales du lobe sous-vertical au stade 25; **D-D'**: lobe optique au stade 25. Les deux gènes s'expriment dans les cellules des lignes latérales 2 et 3. *Sof-msi* s'exprime au niveau des couches granulaires du lobe optique. *Sof-elav1* s'exprime au niveau de la couche pléxiforme ; **E-E'**: ganglion stellaire au stade 25. Barre d'échelle: 200 μ m.

Au cours de la phase 3, *Sof-msi* devient spécifique du système nerveux et sensoriel

Au stade 25 et 26, *Sof-msi* s'exprime nettement dans le système nerveux et sensoriel (**Fig. 37 E-G**) dans :

- La masse supra-oesophagienne (SPM) ;
- Les lobes optiques et les yeux ;
- Les ganglions stellaires ;
- Les ganglions intrabrachiaux ;
- Les organes olfactifs.

Au stade 27-28, les organes olfactifs et les lignes latérales expriment également *Sof-msi* (**Fig. 37 H**). Les expressions internes sont en cours de détermination.

Ces résultats semblent montrer que c'est concomitamment au processus de différenciation des NPCs que *Sof-msi* devient un marqueur du système nerveux de l'embryon de seiche. Une hypothèse serait que lors des étapes de différenciation, des processus de divisions asymétriques doivent permettre le maintien d'un quota de cellules progénitrices dans les ganglions, ce qui pourrait expliquer l'expression de *Sof-msi* dans les ganglions à ce stade de développement. De manière intéressante, nous pouvons constater une complémentarité nette entre les expressions de *musashi* et d'*elav* au niveau de la SPM et des couches pléxiformes et granulaires des yeux (**Fig. 38**), complémentarité déjà constatée chez d'autre espèce (Sakakibara et al., 1996). **Si *Sof-elav1* marque la sortie du cycle cellulaire des cellules nerveuses, *Sof-msi* peut leur permettre de garder leur potentiel prolifératif.** Ainsi l'expression de *Sof-msi* illustre probablement le maintien d'un quota de cellules progénitrices, assez conséquent d'après les sections d'hybridation *in situ*. Il est intéressant de noter que la grande majorité des expressions de *Sof-msi* à ces stades se situent dans les lobes optiques et cérébraux, ceux-là même qui expriment tardivement *Sof-elav1*. L'expression tardive d'*elav* dans les ganglions pourrait permettre une plasticité nerveuse rallongée au cours du développement. De la même manière, le maintien d'une réserve de cellules non différenciées par *Sof-msi* rendrait possible une maturation nerveuse prolongée, utile notamment lors du changement d'environnement faisant suite à l'éclosion. De plus, l'expression de *Sof-msi* concerne essentiellement la masse supra-oesophagienne, et nous n'avons pas détecté d'expression dans la masse sous-oesophagienne au niveau des sections des stades 25. L'expression de *Sof-msi* connu pour être impliqué dans le

maintien d'un état prolifératif indifférencié des cellules pourrait être une explication supplémentaire à la proportion relative plus importante de la SPM chez le juvénile de la seiche. En plus de cette implication probable dans les capacités d'adaptations de l'animal, le maintien d'une population de cellules non différenciées par *Sof-msi* pourrait permettre un auto-renouvellement des cellules, comme chez les planaires où cela a été mis en évidence dans les processus de régénération (Higuchi et al., 2008).

III Interprétations

L'expression de *Sof-elav1* et de *Sof-msi* dans le SN à des stades tardifs de l'organogenèse nous conduisent *a priori* à supposer que chez les céphalopodes, la différenciation neurale des centres de l'apprentissage (lobes cérébraux) est tardive, avec un maintien de cellules non différenciées. Il est possible que les spécificités du SN des céphalopodes, et plus précisément du cerveau, soient directement liées à l'expression particulière de ces mécanismes régulateurs de la neurogenèse. Il semble que c'est un SN très plastique qui se met en place au cours du développement de la seiche, comme l'illustrent les changements de proportions relatives des différents lobes après éclosion. Ce mode de développement rappelle le développement des vertébrés, et plus particulièrement celui des primates. Chez ces derniers, des études ont démontré que la « complexité » du SN, illustrée notamment par la capacité d'apprentissage, est souvent associée à la durée du développement, mais aussi et surtout à un état « d'immaturité » du SN postnatal conduisant à un développement accru du lobe frontal (Bruner & Holloway, 2010). Bien sûr il ne faut pas voir dans ce parallèle la preuve d'une homologie entre le lobe frontal des céphalopodes avec le lobe frontal des primates, mais il est intéressant de constater que les convergences évolutives des capacités cognitives entre les céphalopodes et les vertébrés pourraient se traduire par une différenciation tardive du SN permettant une plasticité prolongée. Il serait de ce fait intéressant de comparer précisément la dynamique de différenciation du SN des céphalopodes avec celui des autres mollusques, mais aussi de voir si ces derniers présentent également des changements de proportions relatives de leur ganglions au cours des phases larvaires et après éclosion.

La suite immédiate de ce travail serait de réaliser une analyse précise et quantitative des processus de mitoses au sein des différents lobes au cours du développement embryonnaire, puis chez le juvénile. Les territoires respectifs des expressions de *Sof-msi* et *Sof-elav1* devront également être établis finement de manière à comprendre, à l'échelle tissulaire, les relations entre cellules progénitrices et leurs éventuelles migrations dans différentes couches corticales. Une autre perspective serait de mener une large étude comparative des dynamiques de différenciation chez différents mollusques pour tenter de relier la diversité de la dynamique de maturation de leur système nerveux avec leur mode de développement et l'environnement larvaire (étude Eco-Evo-Devo), selon que leurs larves sont planctotrophiques ou lécithotrophiques, encapsulées ou nageuses, ou chez différents embryons de céphalopodes en fonction du mode de vie benthique, pélagique ou necto-benthique des juvéniles ou des adultes.

CHAPITRE 2 :

DYNAMIQUE DE REGIONALISATION CHEZ *SEPIA OFFICINALIS*

Les gènes de régionalisation nerveuse médio-latérale et antéro-postérieure

Les gènes *shh*, *nk2.1/scro*, *gsx/ind*, *pax6/ey*, *pax3-7/prd* présentent des répartitions différentielles au niveau du neuroectoderme, participant ainsi à la régionalisation médio-latérale (dorso-ventrale) et à la spécification des sous-types neuronaux chez les bilatériens. La disposition de ces gènes dans le neuroectoderme présente de fortes similitudes entre les vertébrés, les ecdysozoaires, et les annélides lophotrochozoaires (Arendt et al., 2008, Partie I Chapitre 3). En plus de leur rôle connu dans la régionalisation médio-latérale, la majorité de ces gènes présente également une implication dans la régionalisation antéro-postérieure. Les gènes *otx/otd* et *pax2-5-8/sp* en particulier sont connus pour spécifier respectivement les cerveaux antérieur et moyen chez les bilatériens (Partie I Chapitre 3).

Si ces mécanismes restent mal connus chez les céphalopodes et les mollusques en général, une étude a déjà démontré que l'expression de *shh* ne se superpose pas à celle de *pax6* au cours du développement de *S. officinalis* (Navet et al., 2009) (Partie I Chapitre 3), ce qui pourrait illustrer une inhibition de *pax6* par *shh* similaire à celle observée dans le tube neural des vertébrés (régionalisation dorso-ventrale) (Jessel, 2000). En plus des études portant sur les gènes de spécification médio-latérale, des études sur l'expression des gènes *hox* (également connus comme étant impliqués dans la régionalisation antéro-postérieure) menées chez des gastropodes et céphalopodes (*Gibbula varia* : Samadi & Steiner, 2010 ; *Haliotis asinina* : Hinman et al., 2003 ; *Euprymna scolopes* : Lee et al., 2003) ont toutes révélé que ces gènes se répartissent au niveau des ganglions pédieux, pleuraux et viscéraux des larves (origine hyposphère) et viscéraux et pédieux de l'embryon de céphalopode, ainsi que dans ses bras. Aucun mollusque ne présente d'expression de gènes *hox* dans les ganglions cérébraux, que ce soit chez les larves des gastropodes (origine épiphère) ou l'embryon d'*Euprymna scolopes*, lequel ne présente globalement **aucune expression de gène *hox* dans la région cérébrale-optique**. L'absence d'expression des gènes *hox* connus comme étant des marqueurs postérieurs

(Reichert & Simeone, 2001) au niveau de la région cérébrale-optique d'*Euprymna* et l'exclusion des territoires d'expression *shh-pax6* chez l'embryon de *Sepia* sont autant d'éléments qui permettent une première approche de l'orientation et de la régionalisation nerveuse chez un céphalopode. En effet, rappelons qu'en plus du questionnement sur la spécification nerveuse, se pose le problème de l'orientation chez les céphalopodes et les mollusques en général. Ces questionnements ont ainsi déjà conduit à des découvertes majeures chez les céphalopodes et les gastropodes (Nederbragt, 2002a,b,c ; O'Brien & Degnan, 2003 ; Samadi & Steiner, 2010, Partie I Chapitre 3), mais beaucoup d'interrogations subsistent.

Afin d'apporter de nouveaux éléments qui nous permettraient de tester l'hypothèse de la conservation d'un pattern médio-latéral et antéro-postérieur chez les céphalopodes (et donc chez les mollusques), j'ai cherché à établir les profils d'expression des gènes *otx/otd*, *pax2-5-8/sp*, *nk2.1/scro*, *gsx/ind*, *pax6/ey* et *pax3-7/prd* au cours du développement de l'embryon de seiche. L'établissement des profils d'expressions de ces gènes pourrait nous permettre d'acquérir une vision globale de ces mécanismes moléculaires difficilement interprétables lorsqu'ils sont étudiés indépendamment chez les mollusques.

Caractérisation des gènes de régionalisation nerveuse chez *S. officinalis*

La recherche de ces gènes candidats dans la banque EST d'embryons de *S. officinalis* (Bassaglia et al., 2012) a révélé la présence :

- D'un homologue potentiel d'*otx2/orthodenticle*, nommé *Sof-otx2*. La séquence partielle disponible contient un homéodomaine, proche de ceux des homologues d'*otx2* d'autres espèces en blastx (annexe 9 et Fig. 5 article n°2) ;
- D'un homologue potentiel de la famille des gènes *pax6/eyeless*, nommé *Sof-pax6* (annexe 2). La séquence partielle contient un domaine paired et un homéodomaine ;
- D'un homologue potentiel de la famille des gènes *pax3-7/paired*, nommé *Sof-pax3/7* (annexe 3). La séquence partielle contient un domaine paired, un homéodomaine et un octapeptide ;

- D'un homologue potentiel de la famille des gènes *pax2-5-8/sparkling*, nommé *Sof-pax2/5/8* (annexe 4). La séquence partielle contient un domaine paired et un octapeptide.

Un alignement des séquences des gènes *pax* de *S. officinalis* ainsi qu'un arbre phylogénétique sont disponibles à l'annexe 5.

- D'un homologue potentiel de la famille des gènes *nk2.1/scro*, nommé *Sof-nk2.1* (annexe 8). La séquence partielle contenue dans la banque recouvre l'homéodomaine spécifique des gènes *nk2*.

Un gène homologue à *gsx/ind* n'ayant pas été retrouvé dans la banque, la production d'amorces dégénérées à partir d'*Euprymna scolopes* a permis de révéler la présence chez *S. officinalis* :

- D'un homologue potentiel de la famille des gènes *gsx/ind*, nommé *Sof-gsx* (annexe 10). La séquence amplifiée contient un homéodomaine.

Dans un premier temps sera présentée l'analyse de l'expression des gènes de régionalisation columnnaires *Sof-nk2.1*, *Sof-gsx*, *Sof-pax6* et *Sof-pax3/7*. Pour chaque gène, les profils d'expression seront détaillés puis une discussion prenant en compte l'ensemble des résultats sera conduite. Seront ensuite étudiés les gènes *Sof-otx* et *Sof-pax2/5/8*, connus pour interagir au niveau du SN antérieur. Nous verrons s'il est alors possible d'émettre des hypothèses d'orientation ou d'organisation embryonnaire. Enfin nous analyserons l'expression de l'ensemble de ces gènes à une échelle plus locale, au niveau des bras et des yeux en développement. Nous terminerons cette partie par une conclusion générale.

I Régionalisation médio-latérale

1- Etude de l'expression du gène *Sof-nk2.1*

Dès le début de l'organogenèse au stade 16, *Sof-nk2.1* présente une expression clairement délimitée et restreinte à la périphérie de l'embryon dans la **région cérébrale-optique** (face vitellus). Cette expression se dessine en arc de cercle, suivant la morphologie circulaire de l'embryon en phase plane (**Fig. 39**). Le gène ne s'exprime pas dans toute la périphérie, la bouche constitue le centre de l'arc de cercle qui lui-même s'étend de part et d'autre de l'embryon sous les vésicules optiques **jusqu'aux statocystes** (**Fig. 39**). Cette expression clairement délimitée demeure tout au long de l'organogenèse. Cependant, au fur et à mesure de l'extension des piliers des bras, la zone *Sof-nk2.1+* va être recouverte par du nouveau tissu ectodermique (**Fig. 40**).

Dans la région cérébrale-optique, *Sof-nk2.1* s'exprime dans :

- Les ganglions cérébraux, puis dans la masse supra-œsophagienne SPM (**Fig. 40 b'1, b'2, c'1**) ;
- Les ganglions buccaux (**Fig. 40 b'1**) ;
- Les ganglions optiques, puis dans les lobes optiques, uniquement face vitellus (**Fig. 40 d'1**) ;
- Les tractus optiques (**Fig. 40 c'1bis**) ;
- Le tissu céphalique précoce qui sera recouvert au cours du développement par le tissu ectodermique des piliers des bras qui s'étend (**Fig. 40 C, c'1bis**). Ce tissu comporte des cellules nerveuses mises en évidence par *Sof-elav1* (Partie II, Chapitre 1 I ; **Fig. 34**) ;
- La bouche (**Fig. 40 B, b'3**) ;
- L'anus (**Fig. 40 D**) ;
- Le système rénal.

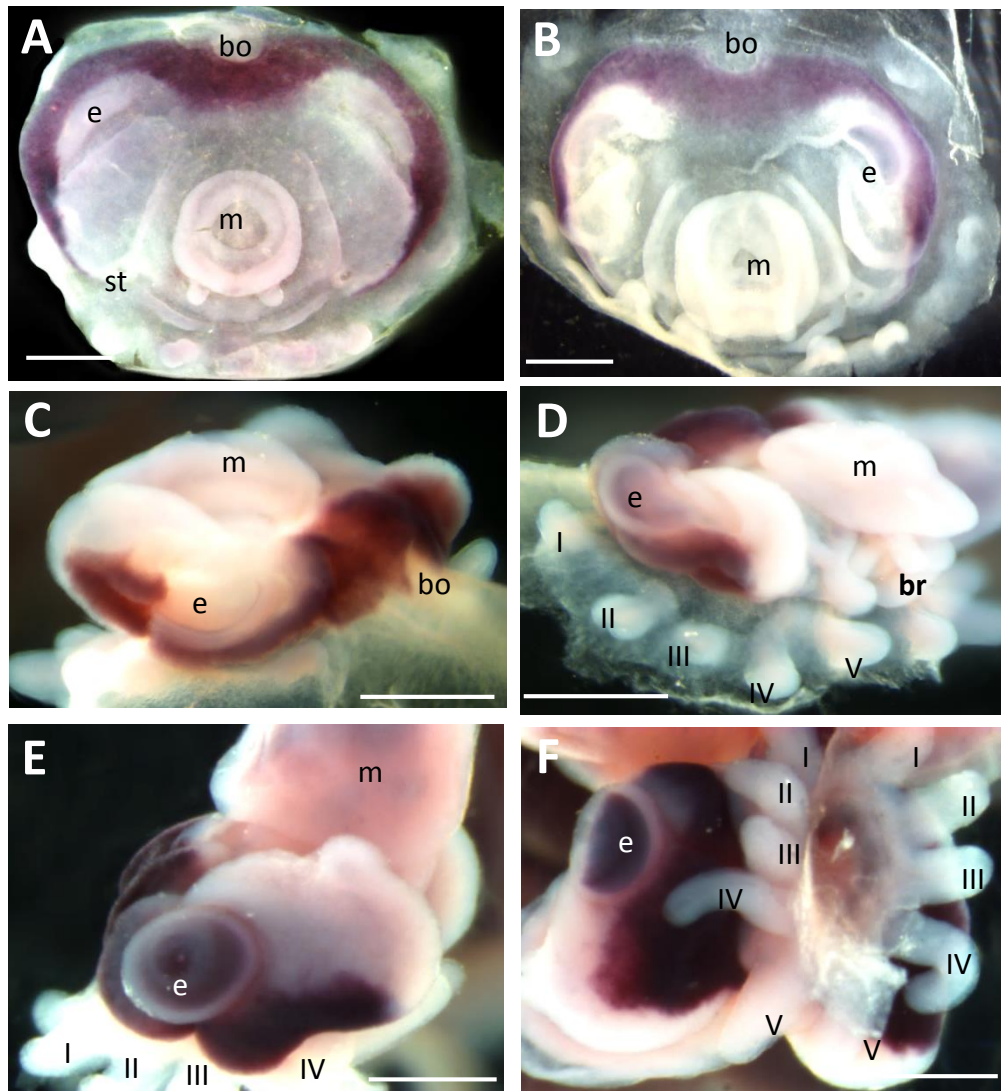


Figure 39 : Expression de *Sof-nk2.1* chez l'embryon de *S. officinalis* au cours du développement. A-B : embryon en phase 1, stades 18 et 19, vue apicale. **C-D :** embryon en phase 2, stade 21, profil droit et profil arrière gauche. **E-D :** embryon en phase 3, stade 23. Profil gauche et vue basale. Les numéros des bras sont indiqués. **bo,** bouche ; **br,** branchies ; **e,** œil ; **m,** manteau ; **st,** statocyste. Echelle : 1 mm.

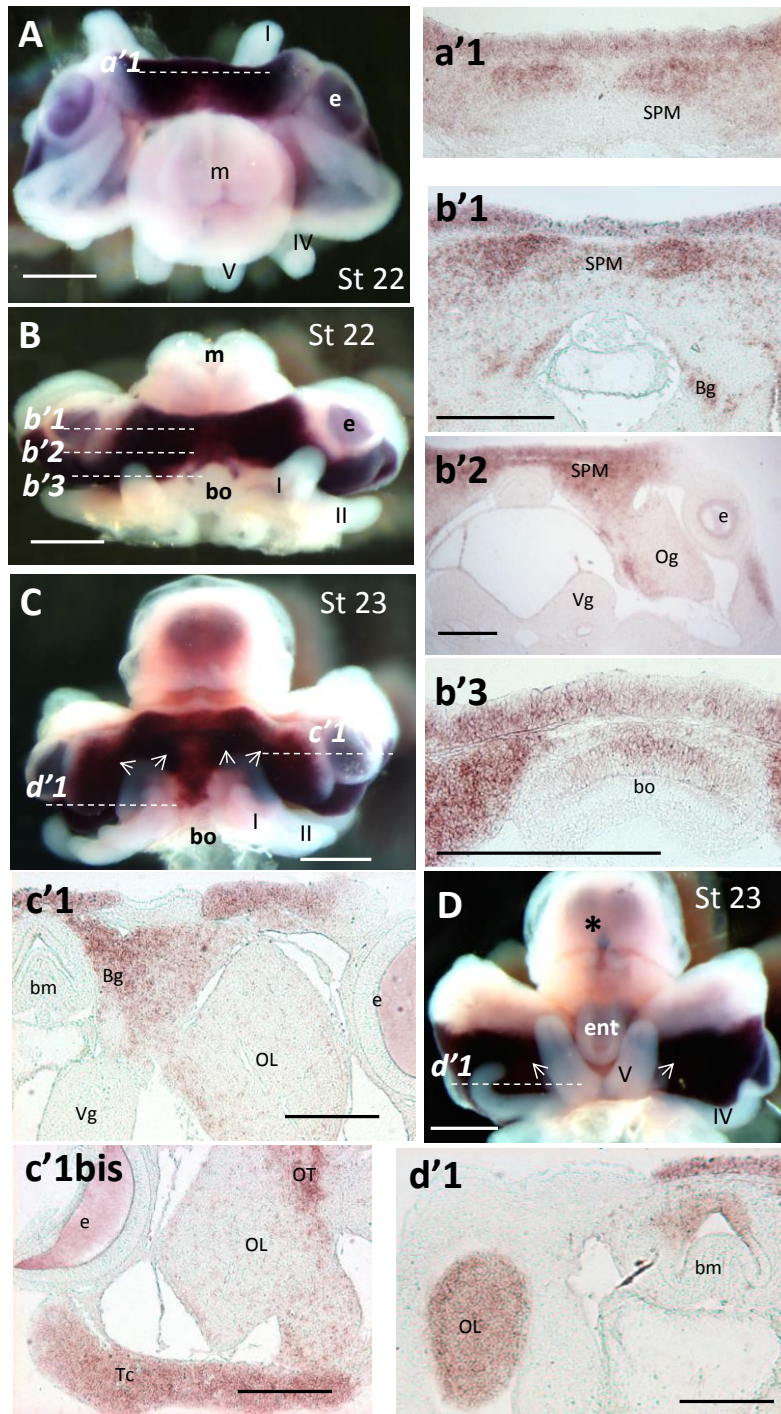


Figure 40 : Expression de *Sof-nk2.1* chez l'embryon de *S. officinalis* au cours du développement. A-D : embryon *in toto*. a'-d'1 : sections correspondant aux emplacements indiqués par des pointillés sur les embryons *in toto*. En C et D les flèches indiquent le processus de recouvrement du tissu céphalique précoce par les piliers des bras. En D, un astérisque noir indique l'anus. Les numéros des bras sont indiqués. **Bg, ganglion buccal ; **bm**, masse bucale ; **bo**, bouche ; **br**, branchies ; **e**, œil ; **ent**, entonnoir ; **m**, manteau ; **Og**, ganglion optique ; **OL**, lobe optique ; **OT**, tractus optique ; **SPM**, masse supra-œsophagienne ; **st**, statocyste ; **tc**, tissu céphalique précoce ; **Vg**, ganglion viscéral. Echelle : 1 mm.**

Au niveau du système nerveux de la seiche, *Sof-nk2.1* s'exprime exclusivement dans les ganglions de la zone cérébrale-optique et ne s'étend pas jusqu'aux territoires gangliogéniques pédieux et viscéraux. Cette expression est donc clairement régionalisée. Les gènes de la famille *nk2.1/scro* sont connus pour s'exprimer dans le neuroectoderme antérieur des bilatériens, et plus spécifiquement au niveau médian (Tessmar-Raible et al., 2007 ; Zaffran et al., 2000 ; Ogasawara et al., 2001). Une telle fonction de régionalisation pourrait ainsi être conservée chez *S. officinalis*. De plus, *Sof-nk2.1* s'exprime dans des ganglions où ont été relevés de fortes condensations de neurones sérotoninergiques (ex. ganglions buccaux, Baratte communication personnelle), or ce sont justement ces sous-types neuronaux qui expriment les orthologues de *Sof-nk2.1* chez les annélides et les vertébrés (**Fig. 30 B et 33**) (Arendt et al., 2008). L'expression de *Sof-nk2.1* n'est pas limitée aux seuls ganglions, mais s'étend à tout un territoire embryonnaire. De manière intéressante, on constate une absence nette d'expression au niveau des bras, alors que la couronne brachiale s'organise de part et d'autre de la bouche en périphérie de l'embryon, adjacente aux territoires *Sof-nk2.1+*. En plus d'une potentielle régionalisation embryonnaire et inter-ganglionnaire (seuls les ganglions du territoire cérébral-optique expriment *Sof-nk2.1*), au niveau des ganglions optiques, *Sof-nk2.1* ne s'exprime que dans la partie faisant face au vitellus, illustrant une régionalisation au sein même des ganglions. Nous remarquons également une expression aux deux extrémités de l'axe bouche-anus. Une expression de *nk2.1* au niveau de la bouche a déjà été observée chez l'embryon d'oursin, et dans l'organe apical (Takacs et al., 2004). Chez l'hémichordé *P. flava*, *nk2.1* s'exprime également dans la « lèvre antérieure » de la bouche et dans l'organe apical (Takacs et al., 2002). Chez l'embryon de seiche, nous constatons aussi que seule la partie supérieure de la bouche exprime *Sof-nk2.1*, ainsi que l'anus. Cette expression délimitée aux extrémités d'origine ectodermique du tube digestif issues du processus de gastrulation pourrait notamment traduire une implication de ce gène dans la mise en place d'une régionalisation A/P, qui suivrait alors logiquement l'axe bouche/anus.

Résumé de l'expression de *Sof-nk2.1* au cours du développement de *S. officinalis* :

- ***Sof-nk2.1* s'exprime dans la région cérébrale et dans la région optique exclusivement sous les yeux, les statocystes marquent la limite de la zone *Sof-nk2.1+* ;**

- *Sof-nk2.1* s'exprime dans les ganglions supra-œsophagiens cérébraux, buccaux et dans les ganglions optiques, mais aussi dans du tissu céphalique. Ainsi toute une région embryonnaire exprime *Sof-nk2.1* ;
- *Sof-nk2.1* ne s'exprime pas dans le manteau, l'entonnoir et les bras.

2- Etude de l'expression du gène *Sof-gsx*

Sof-gsx s'exprime dès le début de l'organogenèse principalement au niveau du tissu céphalique précoce de la région cérébrale-optique. Une expression est également relevée au bord du manteau. A partir du stade 21, *Sof-gsx* s'exprime à la base de la couronne brachiale, puis au stade 23 dans les bras, dans le mésoderme.

Ces expressions se maintiennent tout au long de l'organogenèse. Elles ont un aspect non homogène, et forment des marquages « pigmentés » après hybridation *in situ* (formation d'amas cellulaires marqués) (**Fig. 41**). Ce marquage particulier n'est pas clairement visualisable en coupe (perte du signal), et il semble d'après les observations *in toto* que ce gène soit exprimé au niveau du système nerveux dans les ganglions cérébraux puis dans la masse supra-œsophagienne. Cela reste néanmoins à déterminer. En revanche le marquage reste visible après coupes dans le tissu céphalique (**Fig. 41, H**).

Tout comme *Sof-nk2.1*, *Sof-gsx* s'exprime au niveau de la région cérébrale (au-dessus des ganglions cérébraux). Dans cette région, les territoires d'expression des deux gènes se superposent largement. En revanche au niveau de la région optique *Sof-gsx* se cantonne à la face supérieure au-dessus des vésicules puis des yeux (**Fig. 41 B**), à l'inverse de *Sof-nk2.1* qui s'étend dans la région optique exclusivement sous les yeux (**Fig. 41 B**). Ainsi, ***Sof-gsx* s'exprime dans des zones complémentaires à *Sof-nk2.1* dans la région optique.** Chez la larve trochophore du mollusque *Gibbula varia* (Samadi & Steiner, 2010), *gsx* s'exprime dans les aires présomptives des futurs ganglions cérébraux, autour du stomodaeum et au niveau de l'organe apical, et ne s'exprime pas au niveau des territoires des ganglions sous-œsophagiens, ce qui rejoint les territoires d'expression de ce gène chez l'embryon de seiche. La complémentarité d'expression entre *nk2.2* et *gsx* se retrouve également dans le neuroectoderme chez les vertébrés et la drosophile (Weiss et al., 1998 ; Mizutani & Bier, 2008). L'expression de *Sof-nk2.1* semble de ce fait présenter des similitudes de distribution avec les orthologues *nkx2.1* et *nkx2.2* retrouvés chez les vertébrés. Nous n'avons pas trouvé d'orthologue du gène *nkx2.2* dans la banque ESTs.

Résumé de l'expression de *Sof-gsx* au cours du développement de *S. officinalis* :

- S'exprime majoritairement dans la région cérébrale-optique, les statocystes marquant la limite de la zone d'expression ;
- Dans la région optique, présente une complémentarité d'expression avec *Sof-nk2.1* ;
- Comme *Sof-nk2.1*, ne s'exprime pas dans l'entonnoir, le manteau (hormis une expression très limitée en bordure du manteau) et dans les ganglions sous-œsophagiens ou dans les territoires sus-jacents ;
- S'exprime tardivement dans les bras (Partie II Chapitre 3).

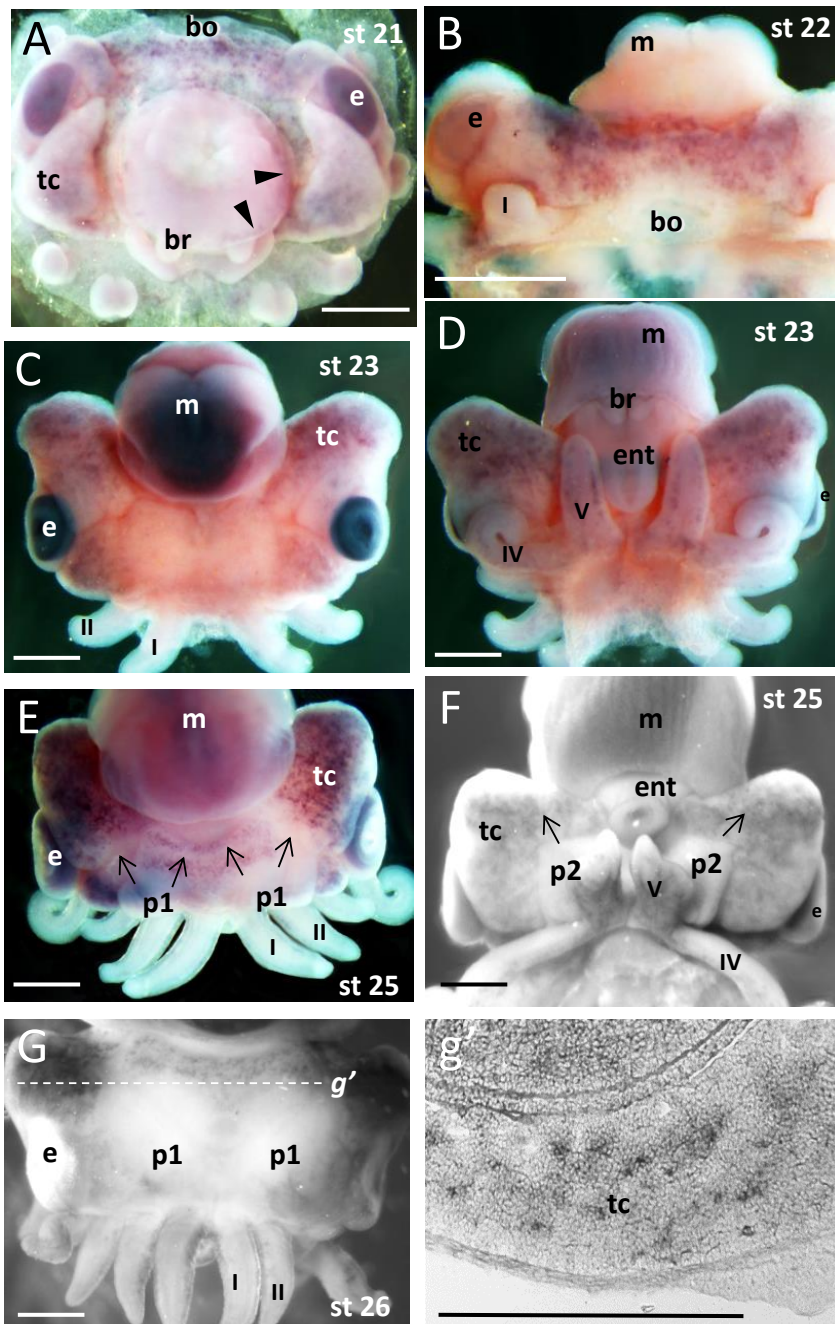


Figure 41 : Expression de *Sof-gsx* chez l'embryon de *S. officinalis* au cours du développement. A-G : embryon *in toto*. g' : section transversale indiquée par des pointillés en G. En A les têtes de flèches indiquent l'expression de *Sof-gsx* en bordure du manteau. En E et F les flèches indiquent le processus de recouvrement du tissu céphalique précoce par les piliers des bras. **bo, bouche ; **br**, branchies ; **e**, œil ; **ent**, entonnoir ; **m**, manteau ; **p1**, pilier 1 ; **p2**, pilier 2 ; **tc**, tissu céphalique précoce. Echelle : 1 mm.**

3- Etude de l'expression du gène *Sof-pax6*

***Sof-pax6* s'exprime au niveau du système nerveux, des yeux et d'autres organes**

Les hybridations *in situ* ont révélé que *Sof-pax6* s'exprime majoritairement dans le territoire cérébral-optique (**Fig. 42**). Les régions concernées sont :

- Le tissu céphalique précoce de la région optique, jusqu'aux statocystes ;
- Les ganglions cérébraux à partir du stade 21, puis la SPM latérale. Au début de l'organogenèse les territoires présomptifs des ganglions cérébraux présentent une légère expression de *Sof-pax6*, qui s'étend aussi sous la bouche (**Fig. 42 A, B, C**) ;
- Les ganglions buccaux à partir du stade 22 (**Fig. 42 c'2**) ;
- Les lobes optiques, très légèrement, visibles au stade 23 ;
- Le tissu sous-pédonculé, tissu neuroendocrinien prenant naissance au centre du lobe optique (**Fig. 42, c'1**) (Nixon & Young, 2003).

Mais également dans d'autres organes :

- Les vésicules optiques puis les yeux, au niveau de la cornée (pas dans la rétine, **Fig. 42 c'1**) ;
- La paroi des branchies (**Fig. 42, d'1**) ;
- Les bras, au niveau ectodermique et dans le système nerveux intrabrachial à partir du stade 23 (Partie II Chapitre 3).

***Sof-pax6* s'exprime dans des zones complémentaires à *Sof-nk2.1* et à *Sof-gsx* dans la région cérébrale-optique**

Sof-pax6 ne s'exprime pas dans le tissu céphalique précoce de la partie cérébrale contrairement à *Sof-nk2.1* et à *Sof-gsx*, mais s'exprime dans les ganglions cérébraux et buccaux dans cette zone. En revanche, ***Sof-pax6* s'exprime dans le tissu céphalique de toute la région optique**, sur et sous la vésicule optique contrairement aux deux autres gènes.

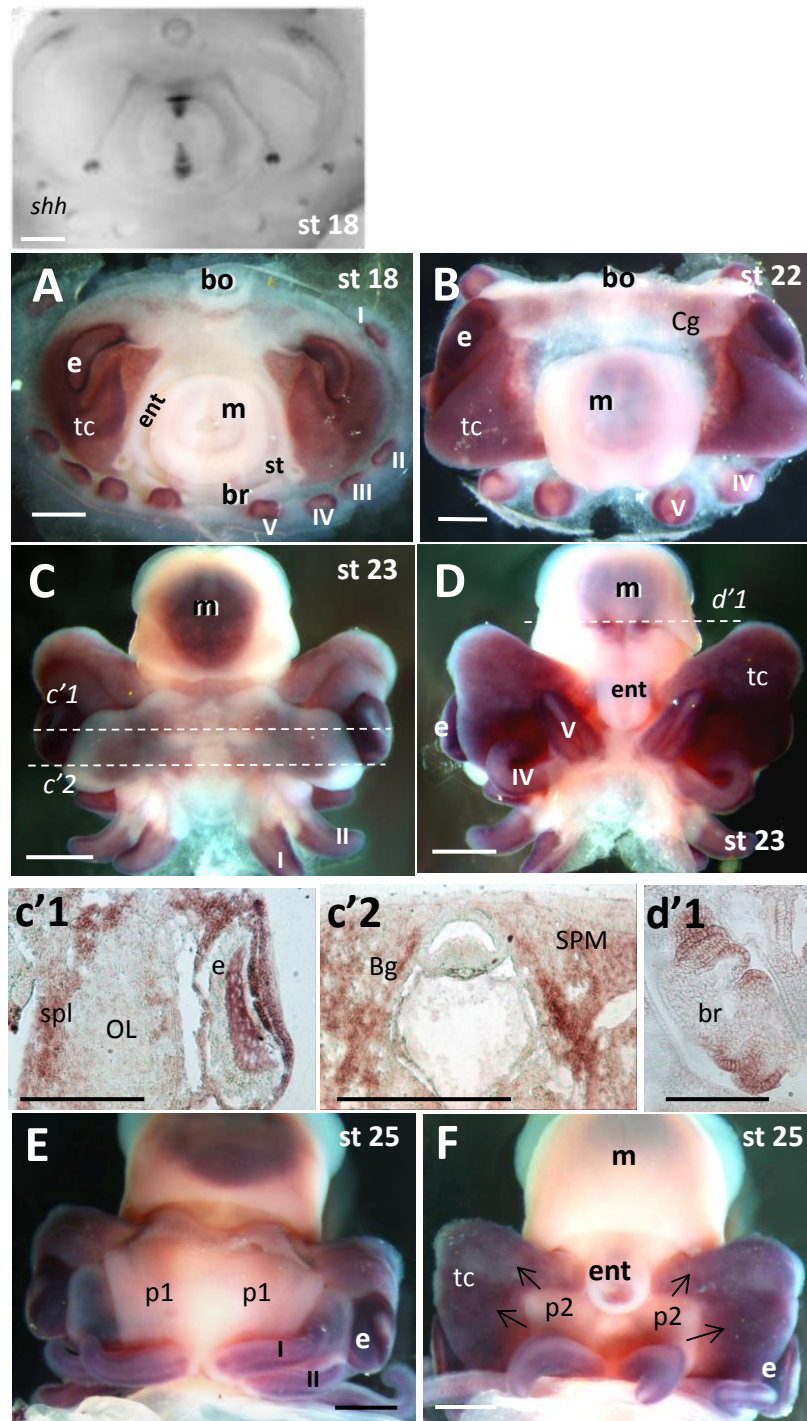


Figure 42 : Expression de *Sof-pax6* chez l'embryon de *S. officinalis* au cours du développement. A-D et E-F : embryon *in toto*. c'1-d'1 : sections transversales indiquées par des pointillés en C et D. En haut à gauche, embryon stade 18 après HIS *shh* (D'après Navet et al., 2009). Les territoires *shh*+n'expriment pas *pax6*+ et vice-versa. En F les flèches indiquent le processus de recouvrement du tissu céphalique précoce par les piliers des bras. **Bg, ganglion buccal ; **bo**, bouche ; **br**, branchies ; **e**, œil ; **ent**, entonnoir ; **m**, manteau ; **OL**, lobe optique ; **p1**, pilier 1 ; **p2**, pilier 2 ; **SPM**, masse supra-œsophagienne ; **st**, statocyste ; **tc**, tissu céphalique précoce. Echelle : 1 mm.**

De précédentes études sur l'expression de *pax6* chez les céphalopodes (Tomarev et al., 1997 : *L. opalescens* ; Hartmann et al., 2003 : *E. scolopes* ; Navet et al., 2009 : *S. officinalis*) avaient déjà révélé des expressions de ce gène dans les yeux et les aires optiques, ainsi que dans les ganglions cérébraux. J'ai pu démontrer néanmoins que dans la partie optique, l'expression de *Sof-pax6* semble davantage concerner le tissu céphalique précoce que les lobes optiques contrairement à ce qui avait été rapporté dans les études antérieures. J'ai également mis en évidence une expression au niveau des ganglions buccaux, et deux phases d'expressions au niveau des bras : une phase d'expression ectodermique et une phase d'expression nerveuse intrabrachiale (Partie II Chapitre 3). Le point le plus intéressant est que par juxtaposition des expressions de *Sof-pax6*, *Sof-gsx* et *Sof-nk2.1*, **toute la région cérébrale-optique** est couverte et que chaque gène comporte ces spécificités d'expression dans cette zone. Ainsi ces gènes ont des expressions complémentaires. Cette complémentarité d'expression se retrouve notamment dans le neuroectoderme des vertébrés et des annélides pour *pax6* et *nk2.1* (Tessmar-Raible et al., 2007). De plus, dans cette région cérébrale-optique, *Sof-pax6* **n'est jamais coexprimé avec *shh*** (Navet et al., 2009), similairement à ce qui est observé au niveau du neuroectoderme des vertébrés (Partie I Chapitre 3). Enfin, **les gènes *Sof-pax6*, *Sof-gsx* et *Sof-nk2.1* ne s'expriment pas dans les ganglions pédieux et viscéraux, et leur limite d'expression coté anus se situe au niveau de l'emplacement des statocystes.**

Résumé de l'expression de *Sof-pax6* au cours du développement de *S. officinalis* :

- **Recouvre les territoires d'expression de *Sof-nk2.1* et *Sof-gsx* dans la région optique, et la limite d'expression se matérialise clairement par les deux statocystes ;**
- **S'exprime dans les ganglions cérébraux et buccaux et ne s'exprime pas au niveau des ganglions pédieux et viscéraux ;**
- **Ne s'exprime pas au niveau du manteau et de l'entonnoir.**

4- Etude de l'expression de *Sof-pax3/7*

***Sof-pax3/7* s'exprime majoritairement au niveau de tissus d'origine ectodermique**

Les hybridations *in situ* ont révélé que *Sof-pax3/7* s'exprime majoritairement au niveau de tissus d'origine ectodermique à la surface de l'embryon, dès le stade 16 (Fig. 1 A-C article n°3). Il s'agit majoritairement de zones tissulaires qui vont s'étendre et recouvrir l'embryon (article n°3 Fig. 1 D-I) pour donner l'épiderme. Les zones d'expression de *Sof-pax3/7* sont :

- La face supérieure des bras puis l'épiderme des piliers des bras visualisable à partir de la phase d'extension, qui va s'étendre sur toute la région céphalique, recouvrant ainsi le tissu céphalique précoce ;
- Une zone située entre les yeux et le manteau dans la région optique (Article n°3), qui va également s'étendre sur la tête jusqu'à rejoindre les piliers des bras. Cette zone est également *Sof-pax6+* ;
- L'épiderme du manteau et de l'entonnoir.

Une expression dans des tissus d'origine ectodermique a déjà été relevée chez d'autres espèces. Chez la drosophile notamment, les gènes de la famille *pax3-7* (*paired*, *gooseberry distal*, *gooseberry proximal*) participent à la formation des segments du corps, en spécifiant le pattern épithélial de chaque segment. De plus, ils jouent un rôle dans la spécification des neuroblastes (Duman-Sheel et al., 1997). D'après nos observations, ce sont des couches cellulaires en migration qui expriment *Sof-pax3/7*, et le processus de recouvrement du tissu céphalique précoce par ces territoires *pax3/7+* est nettement visualisable en coupe (Article n°3). De manière intéressante, les *pax* sont connus pour être impliqués dans les processus de migrations cellulaires, notamment chez les vertébrés. En effet, ils interagissent avec des gènes de molécules d'adhésion cellulaire (Wang et al., 1996), comme les N-CAM et les Ng-CAM (neural/neuroglia cell adhesion molecule). Plus largement, ces gènes sont des régulateurs du développement précoce des crêtes neurales, population cellulaire spécifique des vertébrés, contenant les progéniteurs de différents neurones périphériques, des cellules gliales, des mélanocytes ainsi que d'autres cellules pigmentaires et structures crano-faciales (Le Douarin & Kalcheim, 1999). Durant le développement tardif des crêtes neurales, *pax3* et *pax7* sont retrouvés au niveau des

cellules en migration (NCC), avec des spécificités d'expression selon les espèces (Lacosta et al., 2005 ; Mansouri et al., 1996 ; Minchin & Hugues, 2008). De la même manière, *Sof-pax3/7* semble être également exprimé dans des tissus en extension, ce qui laisse supposer un rôle conservé pour ce gène dans les processus de migrations cellulaires chez les céphalopodes.

Nous avons effectué un parallèle entre l'expression de *Sof-elav1* et de *Sof-pax3/7* (article n°3). En effet, *Sof-elav1* s'exprime, en plus du SN, au niveau des structures sensorielles tégumentaires durant le développement de *S. officinalis* (article n°3). Nous avons ainsi constaté que les structures sensorielles *Sof-elav1+*, à savoir les cellules sensorielles tégumentaires et les lignes latérales, sont comprises dans la région *Sof-pax3/7+*. Seuls les organes olfactifs, situés en région cérébrale-optique sous les yeux, n'expriment que *Sof-elav1* à partir du stade 16. *Sof-pax3/7+* constitue de ce fait un bon marqueur de tissu épidermique chez *Sepia*, et c'est justement dans ce tissu que le système sensoriel tégumentaire de l'adulte se met en place.

Sof-pax3/7 s'exprime également au niveau des cœurs branchiaux dès le stade 17 (**Fig. 43 b'2**). Ce gène ne semble pas intervenir dans la mise en place des autres muscles chez la seiche, même au niveau du cœur systémique, alors que *pax3* joue un rôle important dans la mise en place des muscles squelettiques chez les vertébrés (Buckingham et al., 2005). Cette fonction semble être relativement spécifique aux vertébrés, même si quelques études tendent à démontrer ce rôle de myogenèse chez les ecdysozoaires (ex du nématode, Yi et al., 2009). L'organe de l'entonnoir, ou organe de Verill, exprime également *Sof-pax3/7* à partir du stade 20 (**Fig. 43 g'**). Il se situe à l'intérieur du tube de l'entonnoir et constitue un organe glandulaire aux fonctions inconnues (Mangold et al., 1989). Enfin notons que *Sof-pax3/7* s'exprime légèrement dans un côté des vésicules optiques (**Fig. 43 A**).

***Sof-pax3/7* s'exprime dans les ganglions pédieux**

Dans le système nerveux, *Sof-pax3/7* s'exprime dans les ganglions pédieux puis dans la masse sous œsophagienne antérieure (ASM) à partir du stade 22 (**Fig. 43, c', f'1, f'2**). Ainsi l'expression de *Sof-pax3/7* au niveau du SN est assez tardive. Dans l'ASM, *Sof-pax3/7* s'exprime au niveau des lobes prébrachiaux et brachiaux, majoritairement impliqués dans le contrôle des bras (Boycott, 1961). Si les expressions se répartissent uniquement au niveau de la partie inférieure du neuropile pour chaque lobe, nous ne sommes pas en mesure d'estimer cette délimitation en termes de fonctionnalité à l'heure actuelle.

***Sof-pax3/7* s'exprime majoritairement dans des territoires *Sof-nk2.1*-, *Sof-gsx*- et *Sof-pax6*-**

Si les gènes *Sof-nk2.1*, *Sof-gsx* et *Sof-pax6* s'expriment majoritairement au niveau des régions **cérébrale et optique** et dans les **ganglions supra-œsophagiens**, *Sof-pax3/7* **au contraire** s'exprime au niveau du **manteau, des piliers des bras**, et des **ganglions sous-œsophagiens**. Le gène *Sof-pax3/7* ne présente **aucune zone de coexpression avec les gènes *Sof-nk2.1* et *Sof-gsx***. En revanche certaines régions **coexpriment les gènes *Sof-pax3/7* et *Sof-pax6***, comme la région ectodermique supérieure des bras.

Résumé de l'expression de *Sof-pax3/7* au cours du développement de *S. officinalis* :

- **S'exprime au niveau des bras, du manteau et de l'entonnoir ;**
- **S'exprime majoritairement dans des tissus épidermiques ;**
- **Ne s'exprime pas dans la région cérébrale optique hormis dans une zone limitée de la région optique ;**
- **S'exprime dans les ganglions sous-œsophagiens pédieux puis ASM ;**
- **Ne s'exprime pas au niveau des ganglions supra-œsophagiens cérébraux, buccaux et dans les lobes optiques.**

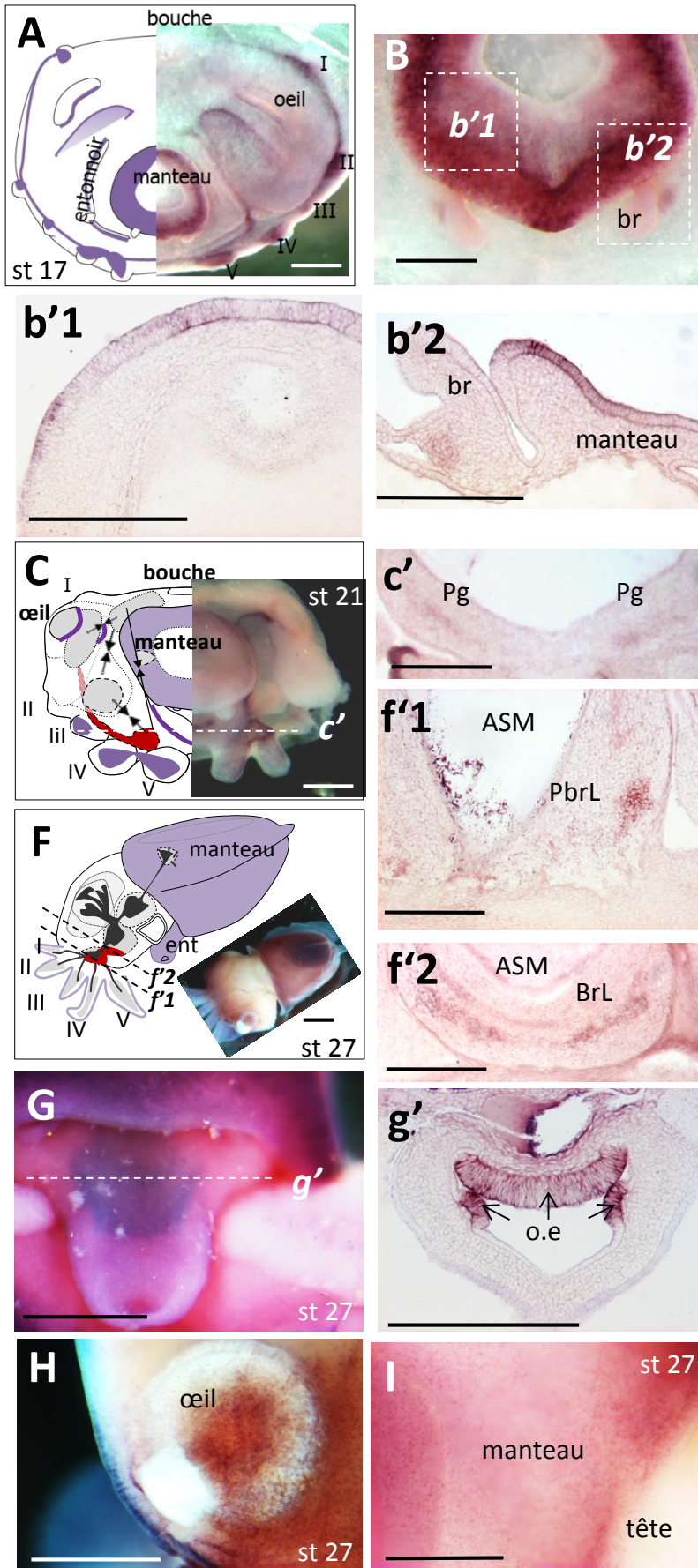


Figure 43 : Expression de *Sof-pax3/7* au cours du développement de *S. officinalis*. En A, C et F des schémas résument les profils d'expressions pour les trois phases de développement. Violet : épiderme ; rouge, ganglions pédieux puis ASM. En G, gros plan sur l'entonnoir. En H et I, gros plans sur l'œil et le manteau, avec visualisation de cellules ectodermiques *Sof-pax3/7+*. Le tissu céphalique précoce de la tête n'a pas encore été totalement recouvert par les territoires *Sof-pax3/7+*. Les plans de sections (transversales sauf pour b'2, longitudinale) sont indiqués par des pointillés sur les images *in toto*. br, branchies ; BrL, lobe brachial ; ent, entonnoir ; o.e : organe de l'entonnoir ; Pg, ganglions pédieux ; PbrL : lobe prébrachial. Echelle : 1 mm.

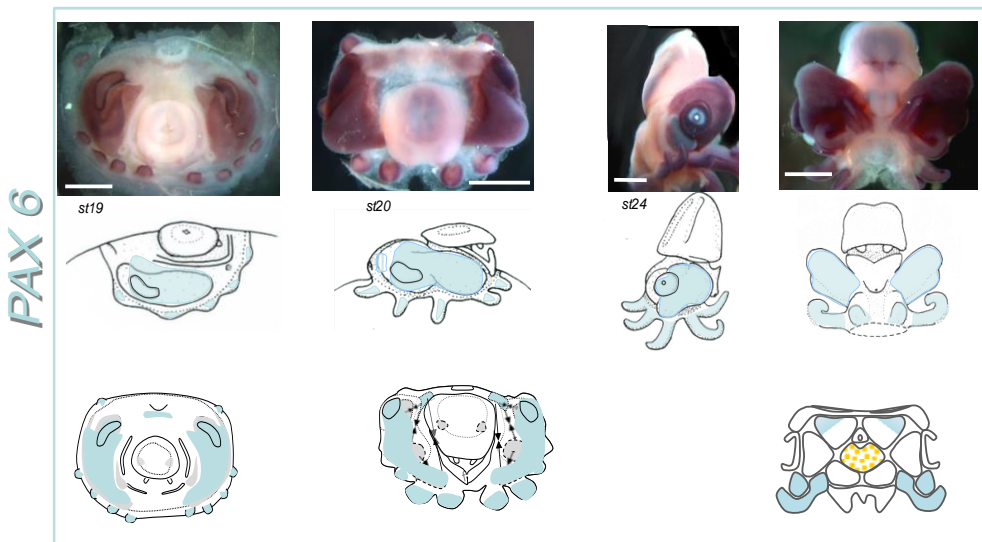
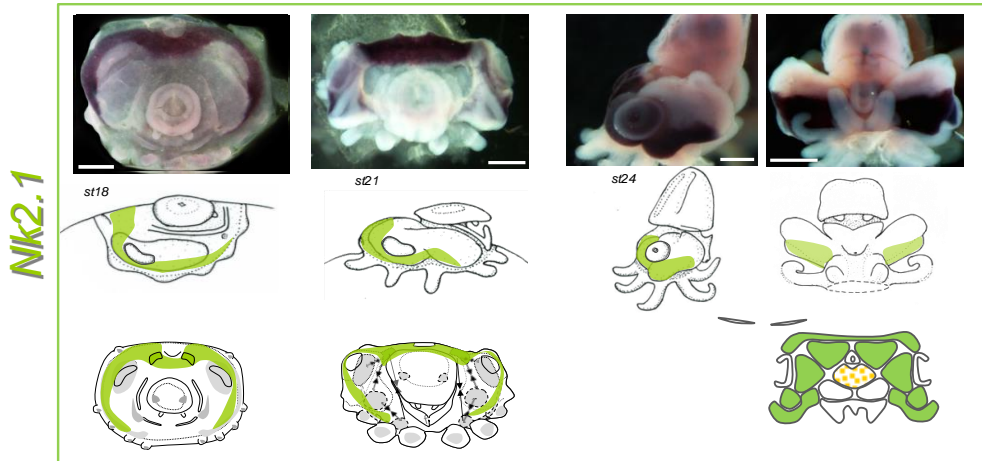
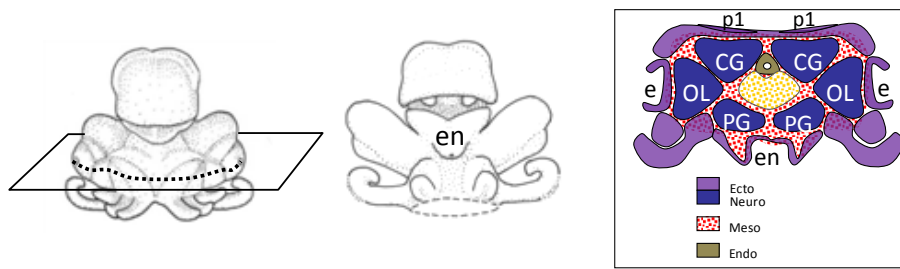


Figure 44 : Schéma récapitulatif des expressions des gènes *Sof-nk2.1* et *Sof-pax6*. En haut à gauche, un embryon présente un plan de coupe, la répartition des couches tissulaires internes est indiquée à droite.

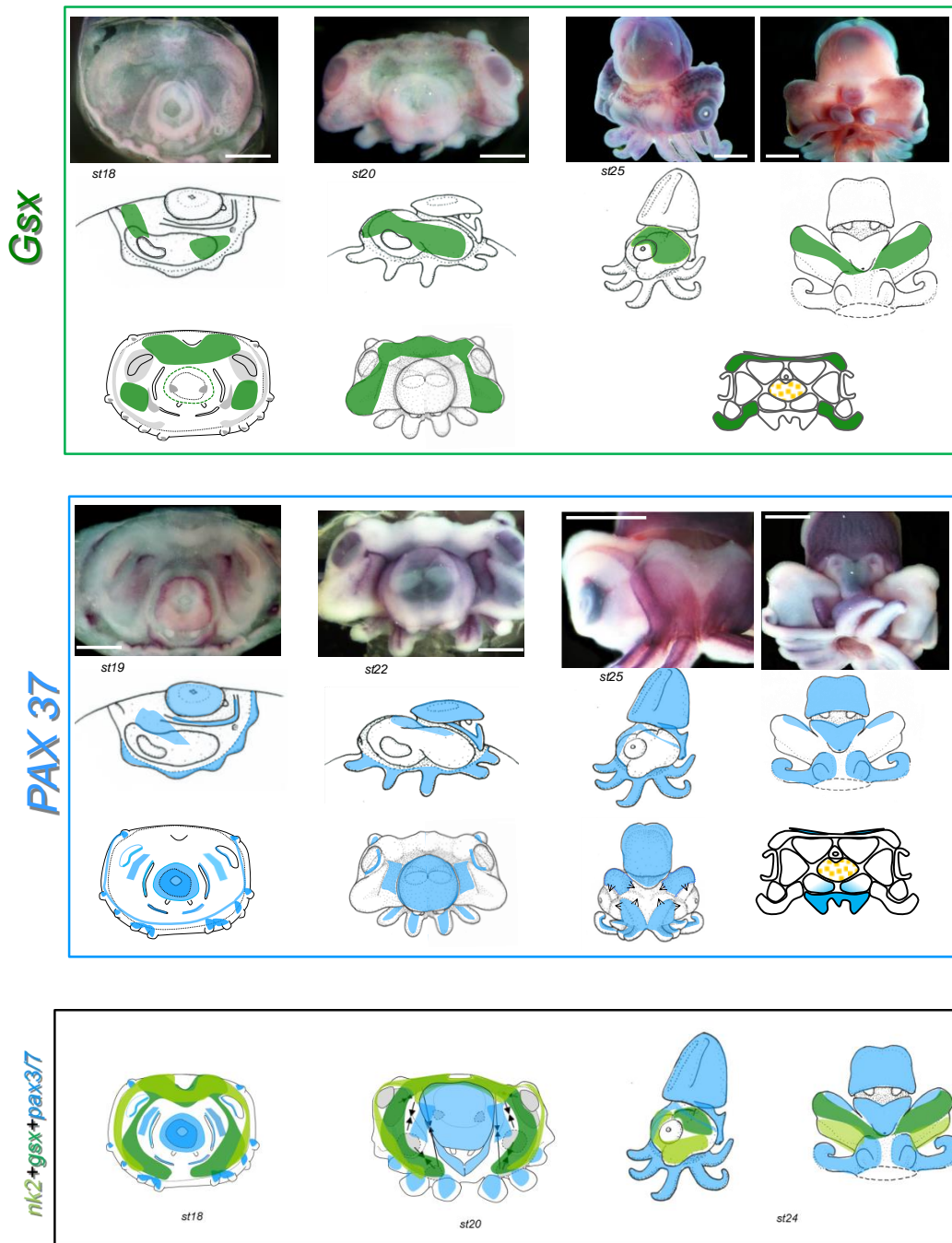


Figure 44 bis : Schéma récapitulatif des expressions des gènes *Sof-gsx* et *Sof-pax3/7*, et superposition des expressions de *Sof-nk2.1*, *Sof-gsx* et *Sof-pax3/7*.

5- Interprétations

Les figures 44 A et B récapitulent les zones d'expressions des gènes *Sof-nk2.1*, *Sof-gsx*, *Sof-pax6* et *Sof-pax3/7*.

L'étude de l'expression des gènes de régionalisation médio-latérale chez *S. officinalis* a révélé que les gènes *Sof-nk2.1*, *Sof-gsx* et *Sof-pax6* s'expriment tous dans la **région cérébrale optique**, que ce soit au niveau du tissu céphalique ou des ganglions sous-jacents qui sont **des ganglions supra-œsophagiens**, et ce dès les stades précoces de l'organogenèse. La répartition spatiale de ces gènes dans cette région céphalique présente néanmoins des différences :

- *Sof-nk2.1*, s'exprime en **périphérie orale de l'embryon**, dans le tissu céphalique de la région cérébrale et optique, sous les vésicules optiques ou les yeux. Il s'exprime dans les **ganglions cérébraux et buccaux**. Dans les **ganglions optiques**, *Sof-nk2.1* s'exprime dans la moitié du ganglion la plus proche du vitellus ;
- *Sof-gsx* s'exprime également **dans la région cérébrale *Sof-nk2.1+***, avec en revanche une expression limitée au-dessus des yeux **dans la partie optique *Sof-nk2.1-***. Son expression intra-ganglionnaire reste à déterminer ;
- *Sof-pax6* présente une expression plus restreinte dans la région cérébrale, **limitée aux ganglions cérébraux et buccaux** à partir du stade 21. *Sof-pax6* s'exprime dans le tissu céphalique de l'ensemble de la **partie optique, où il recouvre les zones *Sof-nk2.1+* et *Sof-gsx+***, à l'exclusion de la région la plus périphérique face vitellus *Sof-shh+*. Son expression dans les ganglions optiques est faible.

A aucun moment ces gènes ne se retrouvent au niveau de ganglions sous-œsophagiens. Ils ne s'expriment pas non plus dans la région située entre les statocystes et l'entonnoir, ni dans les tissus ectodermiques et mésodermiques du manteau et dans les ganglions stellaires. Si *Sof-pax6* s'exprime au niveau des bras ainsi que *Sof-gsx*, plus tardivement (Partie II Chapitre 3), aucun de ces trois gènes ne se retrouve néanmoins au niveau des piliers des bras, tissu d'origine ectodermique qui finit par recouvrir la tête de l'embryon. Ainsi, **la région cérébrale-optique *Sof-nk2.1+*, *Sof-gsx+* et *Sof-pax6+* est recouverte *in fine* par le tissu en provenance des bras**, qui n'exprime aucun de ces trois gènes. Les gènes *Sof-nk2.1*, *Sof-gsx* et *Sof-pax6* se répartissent donc tous dans la **région cérébrale-optique**, et ce suivant un axe bouche-anus

(région cérébrale vs optique, exemple de *Sof-pax6* exprimé dans le tissu céphalique de la région optique seulement) et **périphérie-centre** de l'embryon (exemple des expressions de *Sof-nk2.1* et de *Sof-gsx* dans la région optique).

***Sof-pax3/7* au contraire s'exprime au niveau des piliers des bras, du manteau et de l'entonnoir.** Ainsi les territoires *Sof-pax3/7+* deviennent sus-jacents aux territoires *Sof-nk2.1+*, *Sof-gsx+* et *Sof-pax6+*. *Sof-pax3/7* est exclu de la région cérébrale-optique, hormis dans une zone précise qui constitue comme les piliers une zone ectodermique recouvrante (Article n°3) *Sof-nk2.1-* et *Sof-gsx-*. A partir du stade 22, ***Sof-pax3/7* s'exprime au niveau des ganglions pédiés (sous-œsophagiens).** Au niveau des bras, de l'entonnoir et du manteau, les gènes *hox* sont également exprimés chez *Euprymna scolopes* (Lee et al., 2003), il y a donc de forte chance que ce soit également le cas chez la seiche. Ainsi, **les territoires *Sof-pax3/7+* sont vraisemblablement *hox+*.**

La distribution des différents gènes de régionalisation médio-latérale dans la région cérébrale-optique semble présenter des similitudes avec les distributions des gènes orthologues chez les espèces modèles. Notons le non chevauchement de *shh* et *pax6*, ou encore les complémentarités d'expression entre *nk2.1* et *gsx*. En revanche, ces profils ne sont pas limités au système nerveux et semblent impliqués dans la mise en place de territoires embryonnaires globaux. De plus, *nk2.1* et *shh* présentent habituellement une position médiane dans le neuroectoderme, or ici ce sont les gènes les plus latéraux situés en périphérie de l'embryon. Chez le gastropode *P. vulgata*, *hh* s'exprime au niveau médian de la larve trochophore, suivant l'axe bouche-anus en traversant la région du pied (Nederbragt et al., 2002c). L'expression périphérique de *shh* et de *nk2.1* chez *Sepia* peut être liée au type de développement télolécithe. En effet, l'embryon est « éclaté » sur une boule de vitellus, et ce n'est que plus tard au cours du développement que la périphérie de l'embryon va se resserrer sur le vitellus et former un territoire embryonnaire distinct à part entière. Ainsi, nous pourrions alors considérer la périphérie embryonnaire comme étant la partie médiane de la région cérébrale-optique, la partie latérale se trouvant vers le centre de l'embryon (**Fig. 45**). D'autres expressions corroborent cette hypothèse. Chez les vertébrés, *shh* s'exprime au niveau de la corde, et active l'expression de certains gènes de spécification en partie ventrale du tube neural (tel que *nk2*) ou inhibe d'autres gènes, limitant alors leur expression au niveau dorsal du tube (tels que *pax6* et *pax3/7*) (Partie I Chapitre 3). Au niveau de la périphérie de la région cérébrale optique de *Sepia*, l'expression de *Sof-shh* chevauche celle de *Sof-nk2.1*. Viennent ensuite plus latéralement les expressions des gènes *Sof-gsx* et *Sof-pax6*, non chevauchants avec la région

Sof-shh+ mais complémentaires aux territoires *Sof-nk2.1*+. La disposition des gènes de régionalisation médio-latérale chez la seiche présente donc des similitudes avec celle observée dans le neuroectoderme des vertébrés.

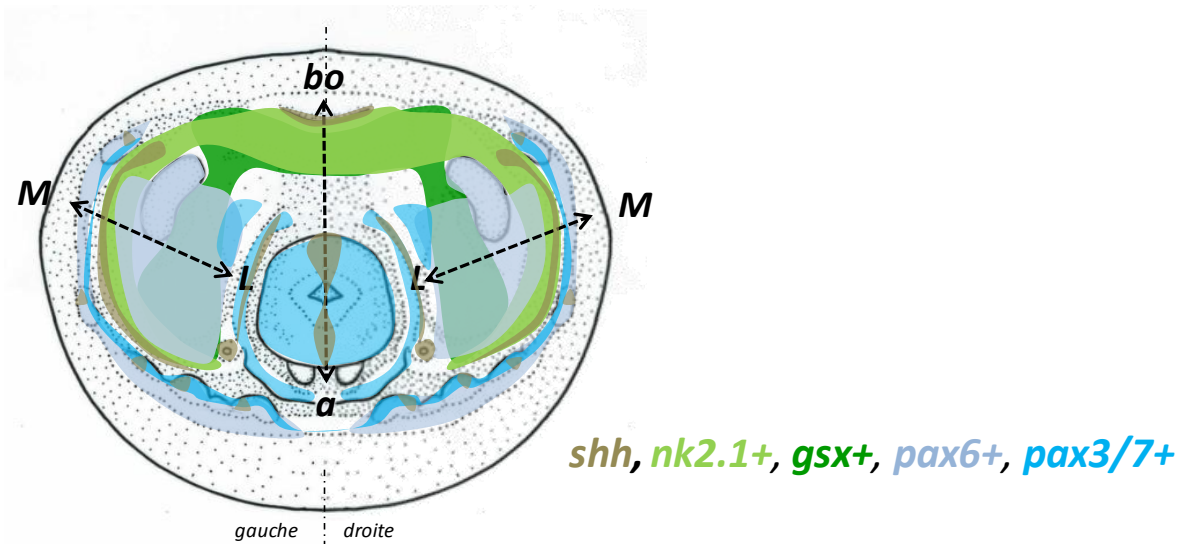


Figure 45 : Disposition de l'expression des gènes de régionalisation médio-latérale. *bo-a*, bouche-anus ; *M-L*, médio- latéral.

Ces résultats ne traduisent certainement pas des homologies de systèmes ou de territoires entre espèces, il est en effet peu probable que la périphérie de la région cérébrale optique de l'embryon de seiche soit homologue à la corde des vertébrés. Néanmoins ils semblent mettre en lumière des conservations de distributions géniques, ce qui est extrêmement intéressant d'un point de vue évolutif. Si les réseaux moléculaires semblent conservés, nous ne nous plaçons plus à une échelle nerveuse mais à une échelle globale embryonnaire chez les céphalopodes, ce qui prouve une fois encore l'importance et la nécessité de considérer des espèces aux organisations dérivées lors des études d'Evo-Dévo du système nerveux.

II Régionalisation antéro-postérieure

1- Etude de l'expression de *Sof-otx2*

(Article n°2)

Sof-otx2* s'exprime au niveau du système nerveux et des yeux chez *S. officinalis

Dès le stade 16, *Sof-otx2* présente une expression intense dans les vésicules optiques. Au stade 19, des sections révèlent que le gène se localise plus spécifiquement au niveau de la **couche rétinienne**. Cette expression persiste tout au long de l'organogenèse (Fig. 2 article n°2). **Du stade 16 au stade 19**, donc durant toute la phase 1, **l'expression de *Sof-otx2* est restreinte aux yeux**. La présence de transcrits du gène n'est pas révélée au niveau des territoires présomptifs de ganglions, alors qu'ils sont déjà en place. Cette observation semble indiquer que *Sof-otx2* n'est pas impliqué dans la mise en place précoce du SN, alors qu'*otx2* joue un rôle neural avant même la gastrulation chez les vertébrés (Simeone et al., 1992).

A partir du stade 20, *Sof-otx2* s'exprime au niveau des ganglions optiques (Fig. 2 article n°2). Cette expression va perdurer durant toute l'organogenèse, puisqu'elle se retrouve plus tardivement au niveau des lobes optiques.

A partir du stade 21, *Sof-otx2* s'exprime au niveau des territoires cérébraux, futurs composants de la SPM. Cette expression uniforme persiste jusqu'au stade 23 dans les ganglions. A partir du stade 23-24, les ganglions cérébraux forment la SPM, et le neuropile ainsi que les différents lobes se distinguent bien en section (Fig. 9 article n°2). L'expression de *Sof-otx2* se restreint alors à certaines régions de la SPM, à savoir le **lobe frontal supérieur, le lobe basal médian et le lobe sous-pédonculé**. Cette expression se maintient jusqu'à la fin de l'organogenèse. Concomitamment, **au stade 21 *Sof-otx2* s'exprime au niveau des ganglions pédieux**, composants de la future ASM et MSM. Cette expression est assez fugace puisqu'elle disparaît au stade 23.

La **figure 46** récapitule l'expression de *Sof-otx2* au cours du développement de *S. officinalis*.

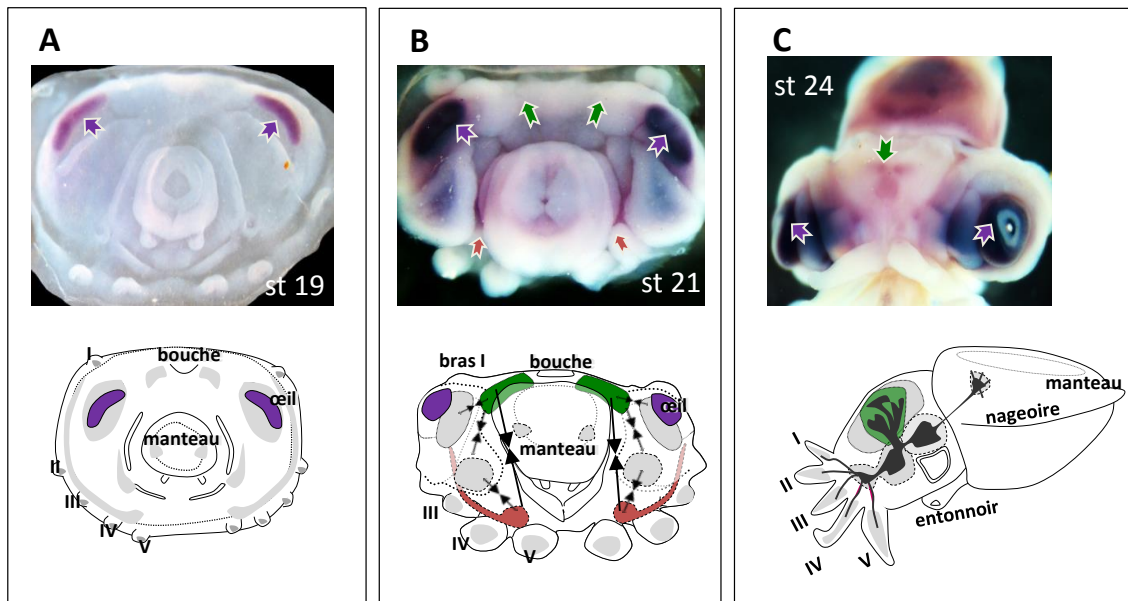


Figure 46 : Expression de *Sof-otx2* chez l'embryon de *S. officinalis* au cours du développement. A-C : trois phases de développement. Ligne du haut : photos des embryons après HIS *in toto* avec indications des expressions par code couleur (flèches) illustrant l'expression du gène dans différents territoires. Ligne du bas : schémas avec légendes et code couleur. Violet : vésicules optiques et yeux ; Vert : ganglions cérébraux et SPM ; Rouge : ganglions pédieux. Echelle : 1 mm.

En phase 2, *Sof-otx2* s'exprime au niveau des territoires gangliogéniques cérébraux et pédieux. Ce gène s'exprime donc dans des territoires qui vont donner respectivement les masses supra-œsophagienne et sous-œsophagiennes antérieure et médiane. *Sof-otx2* constitue ainsi le seul gène de spécification étudié qui s'exprime à la fois au niveau du SN supra-œsophagien et sous-œsophagien. Seules les masses qui se situent à l'avant du cerveau sont *Sof-otx+*. En effet, la masse sous-œsophagienne postérieure dérivée des ganglions viscéraux n'exprime pas *Sof-otx*. Les gènes de la famille *otx2/otd* sont connus pour être des marqueurs très conservés du système nerveux antérieur chez les vertébrés et les insectes (Partie I Chapitre 3). Si l'expression tardive de *Sof-otx* ne corrobore pas une implication de spécification neurale précoce pour ce gène, il est néanmoins possible qu'il constitue un « marqueur d'antériorité ». En partant de l'hypothèse que *Sof-otx2* est un marqueur d'antériorité également chez *S. officinalis*, le cerveau « antérieur » ne se limite pas à la masse supra-œsophagienne, mais s'étend au niveau des masses sous-œsophagiennes antérieures. Le cerveau des céphalopodes, issu d'un système ganglionnaire discontinu, présente au final une unicité d'organisation morphologique, par la fusion des masses et lobes. Si cette répartition de *Sof-otx2* traduit bel et bien un processus de régionalisation, nous pouvons supposer qu'en plus de cette unicité morphologique, il existe une cohésion

moléculaire, similaire à celle retrouvée au niveau des cerveaux des vertébrés par exemple. En effet, si la plupart des gènes de spécification semblent présenter des expressions différentielles dans les ganglions nerveux en fonction de leur position par rapport à l'œsophage, il est possible que d'autres gènes tels qu'*otx* s'expriment en fonction d'une régionalisation à l'échelle du cerveau global et non plus de ces composants. Une telle possibilité pourrait notamment nous aider à comprendre les spécificités du cerveau des céphalopodes.

2- Etude de l'expression de *Sof-pax2/5/8*

L'expression de *Sof-pax2/5/8* présente des similitudes avec *Sof-pax3/7*

Dès le début de l'organogenèse, *Sof-pax2/5/8* va s'exprimer dans (Fig. 47) :

- L'épiderme du manteau qui est également *Sof-pax3/7+* ;
- Les branchies (Fig. 47 c') ;
- Les bras, dans le coté dirigé vers l'anus (Fig. 47 A, a', B, b'2 ; Partie II Chapitre 3) ;
- Le tube de l'entonnoir, dans la couche interne (Fig. 47 b'2) ;
- Les ébauches des nageoires, puis les nageoires (Fig. 47 b'1 ; Fig. 48 b'1).

Au début du développement, *Sof-pax2/5/8* ne s'exprime pas dans la région cérébrale-optique, mais dans les territoires du manteau, des bras et de l'entonnoir, ce qui rejoint les territoires d'expressions de *Sof-pax3/7*.

A partir du stade 21, nous observons une expression de *Sof-pax2/5/8* au niveau des ganglions stellaires situés dans le manteau (Fig. 47 b'3). Il s'agit du seul gène de spécification étudié qui s'exprime dans ces ganglions. Plus généralement, seule l'étude de Lee et al. (2003) avait relevée des expressions au niveau des ganglions stellaires pour les gènes *hox*.

A partir du stade 23 (phase 3), de nouvelles expressions de *Sof-pax2/5/8* apparaissent dans :

- L'organe de l'entonnoir, aussi *Sof-pax3/7+* (Fig. 48, d'2) ;
- Le lobe inter-basal (Fig. 48, d'2) ;
- Les masses sous-œsophagiennes antérieure et médiane (Fig. 49) ;
- Le système nerveux intra-brachial (Partie II Chapitre 3).

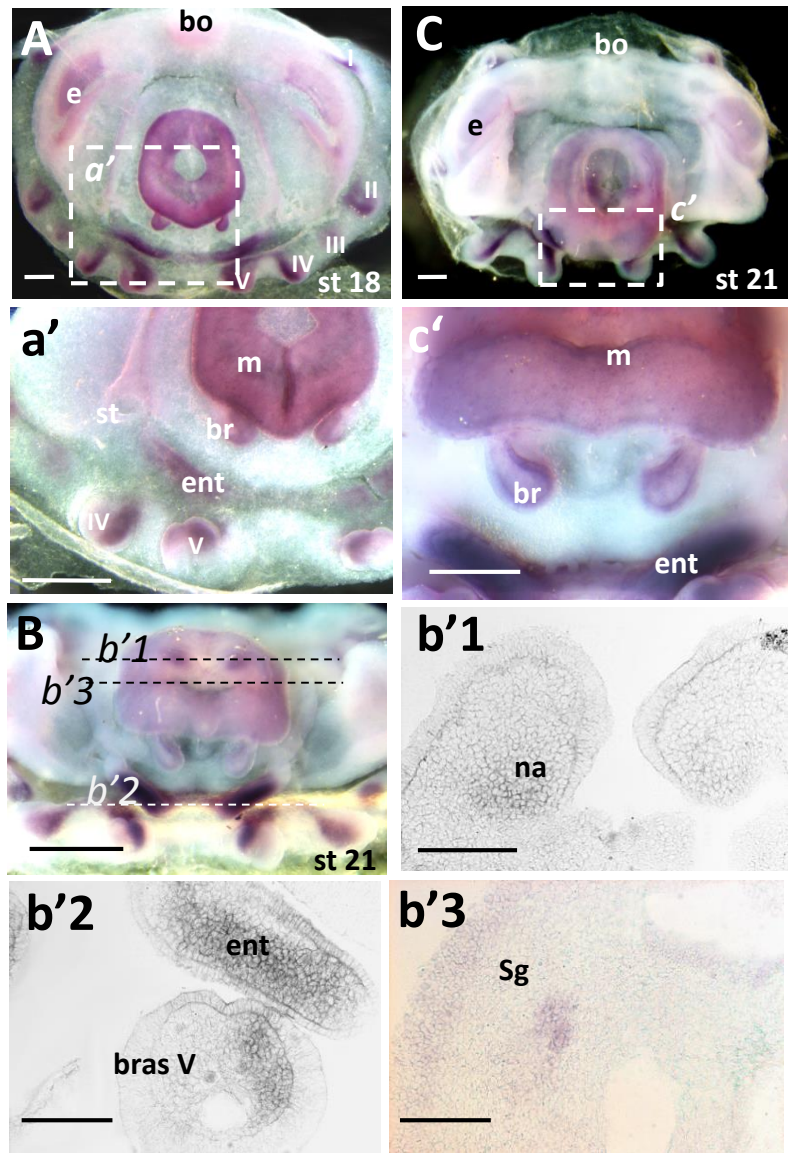


Figure 47 : Expression de *Sof-pax2//5/8* chez l'embryon de *S. officinalis* au cours des phases 1 et 2. Les agrandissements sont indiqués par des rectangles en pointillés blancs, les sections par des lignes pointillées. **bo, bouche ; **br**, branchie ; **e**, œil ; **ent**, entonnoir ; **m**, manteau ; **na**, nageoire ; **Sg**, ganglion stellaire ; **st**, statocyste. Echelle 200µm.**

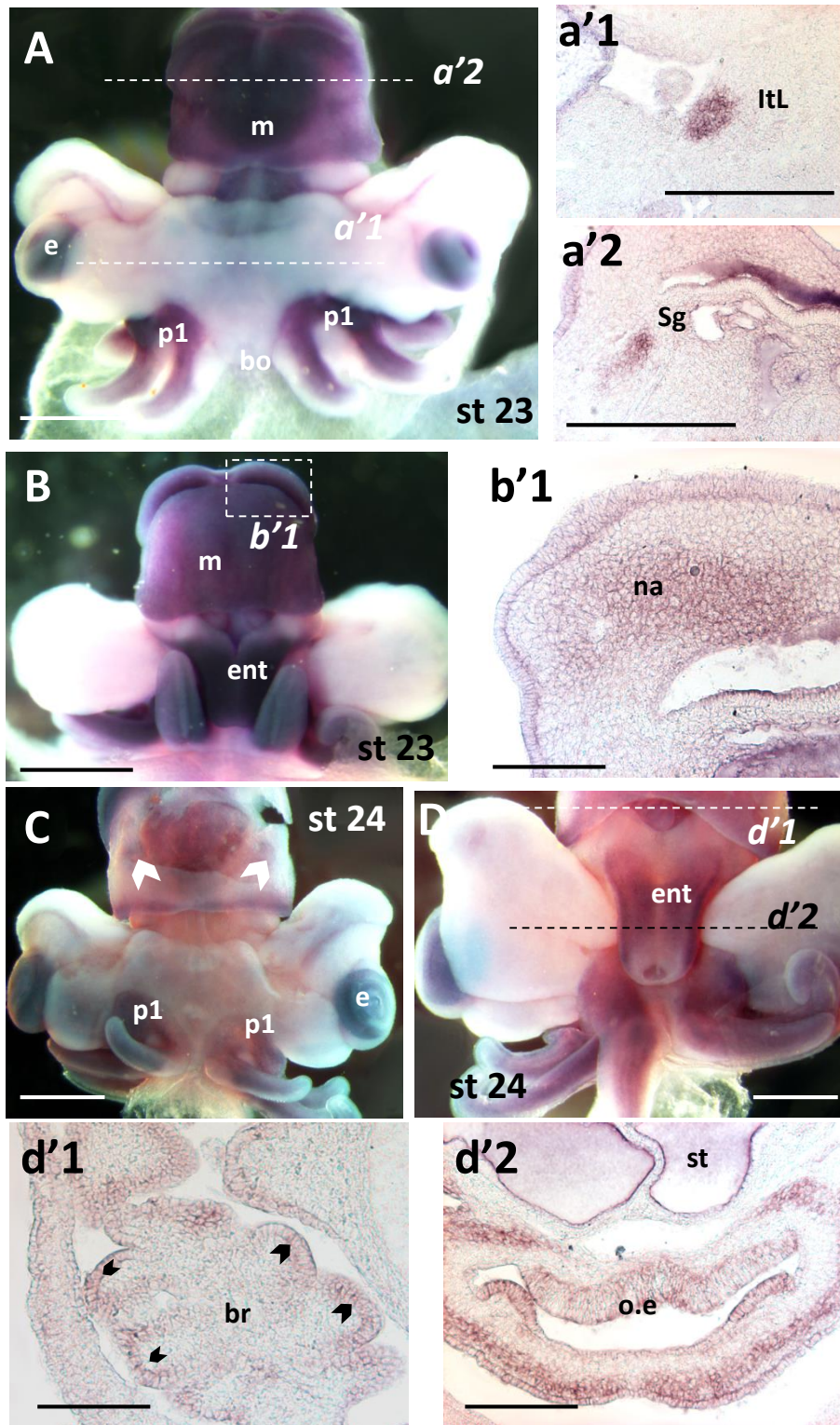


Figure 48 : Expression de *Sof-pax2//5/8* chez l'embryon de *S. officinalis* au cours de la phase 3. Les sections sont indiquées par des lignes pointillées. En C, les flèches blanches marquent l'emplacement des ganglions stellaires. En d'1, les pointes noires indiquent l'expression de *Sof-pax2//5/8* dans l'ectoderme des branchies. **bo**, bouche ; **br**, branchie ; **e**, œil ; **ent**, entonnoir ; **ItL**, lobe interbasal ; **m**, manteau ; **na**, nageoire ; **o.e** : organe de l'entonnoir ; **p1**, pilier des bras 1 ; **Sg**, ganglion stellaire ; **st**, statocyste. Echelle *in toto* :1mm ; Echelle sections :200µm.

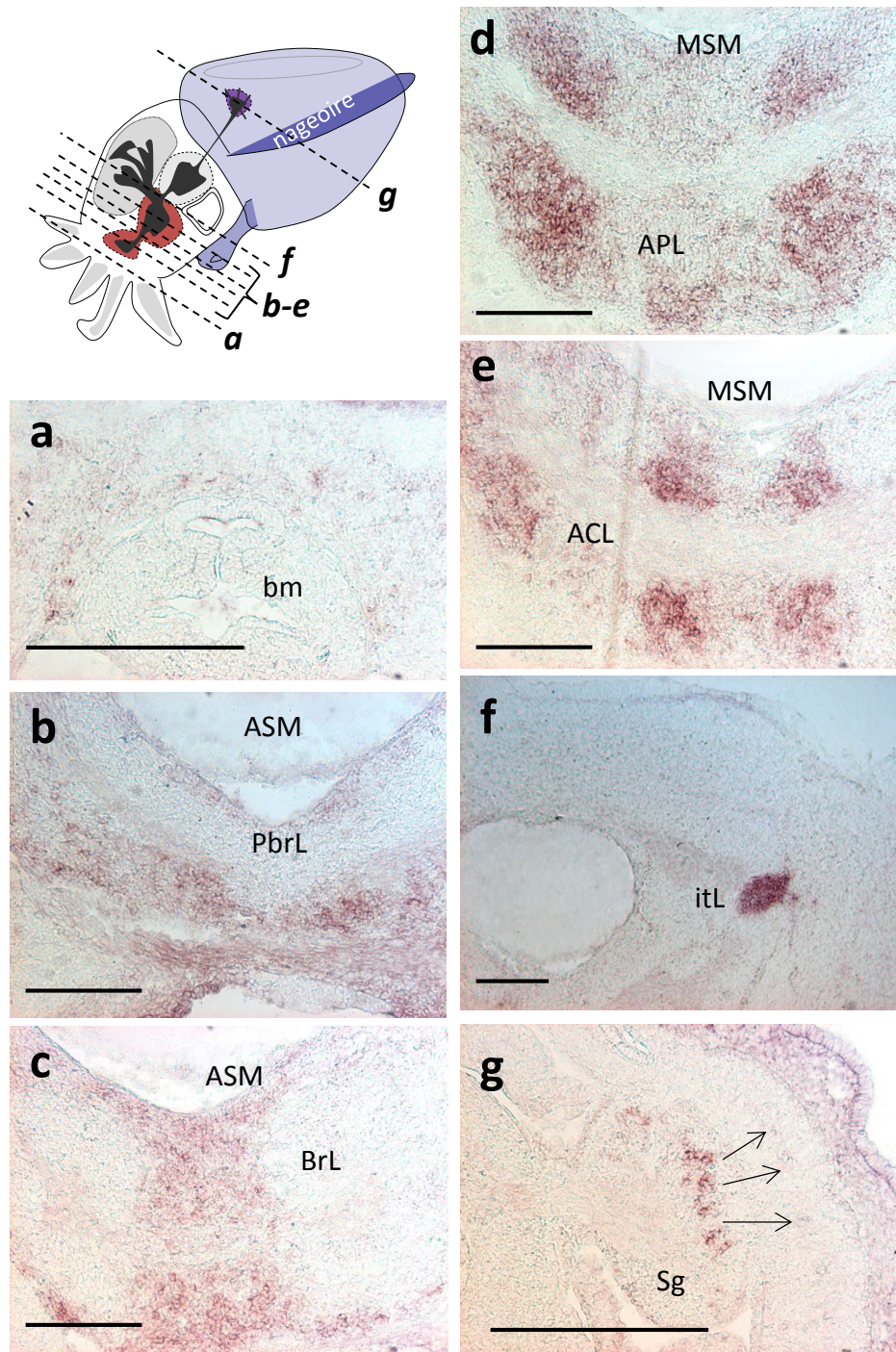


Figure 49 : Expression de *Sof-pax2//5/8* dans le SN de l'embryon de *S. officinalis* au cours de la phase 3. Les sections sont indiquées par des lignes pointillées sur le schéma en haut à gauche. En g, les flèches indiquent les projections nerveuses efférentes qui partent innervier les muscles. **ACL**, lobe des chromatophores antérieur ; **APL**, lobe pédieux antérieur ; **ASM**, masse sous-œsophagienne antérieure ; **bm**, masse buccale ; **BrL**, lobe brachial ; **itL**, lobe interbasal ; **MSM**, masse sous-œsophagienne médiane ; **PbrL**, lobe pré-brachial ; **Sg**, ganglion stellaire ; **st**, statocyste. Echelle : 200 μ m.

***Sof-pax2/5/8*, un élément de réponse à la question de l'évolution du tube de l'entonnoir et des bras ?**

Tout au long du développement, *Sof-pax2/5/8* s'exprime nettement au niveau des bras et du tube de l'entonnoir, mais pas au niveau de la poche de l'entonnoir. Une hypothèse stipule que la partie postérieure du pied serait également à l'origine du tube de l'entonnoir (Bandel & Boletzky, 1988 ; Boletzky, 1989). Shigeno et al. (2008) ont montré sur le Nautilé que les compartiments embryonnaires de développement de la partie céphalique sont distincts de ceux des tentacules, corroborant l'origine pédieuse des bras. De plus ces derniers sont sous le contrôle des ganglions pédieux, comme pour les bras des coléoides (Boletzky, 2003). Cependant, Shigeno et al. (2008) rejettent l'idée d'une « origine pied » du tube de l'entonnoir, qui ne dériverait pas des mêmes territoires embryonnaires que les bras. Ainsi les bras posent bien des questions et des débats non résolus quant à leur origine. L'expression de *Sof-pax2/5/8* au niveau de ces deux structures pourrait néanmoins constituer un premier élément moléculaire confortant une origine pédieuse pour les bras et le tube de l'entonnoir.

Sof-pax2/5/8* semble impliqué dans la mise en place du SN neuro-musculaire de *S. officinalis

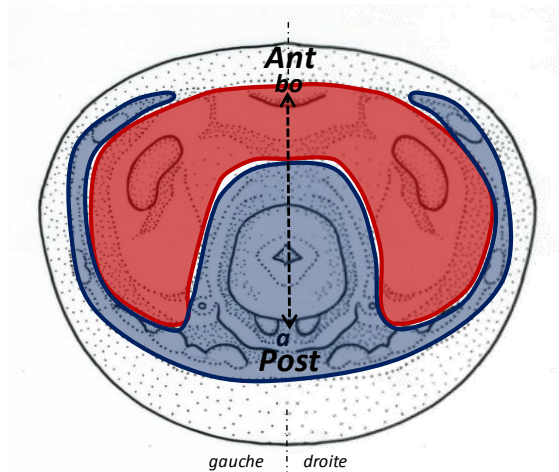
Tout comme *Sof-otx2*, l'expression de *Sof-pax2/5/8* au niveau de structures nerveuses est relativement tardive au cours du développement. De la même manière, chez la drosophile, des études complémentaires ont démontré que l'expression de *pax2/5/8* est tardive (Urbach, 2007), ce qui discrédite une implication de ce gène dans la spatialisation, contrairement à ce qui a pu être observé chez les vertébrés. De plus, l'implication de ce gène dans la mise en place d'une frontière cerveau moyen-antérieur n'est en réalité pas clairement définie dans chaque groupe de chordés, l'enchaînement des gènes *otx-pax2/5/8-hox* pouvant même se retrouver dans d'autres organes que le SN (Canestro et al., 2008). La distribution de *pax2/5/8* se pose de ce fait davantage en termes de fonctionnalité qu'en termes de spatio-temporalité. Chez les vertébrés, *pax2* et *pax8* s'expriment dans des populations d'interneurones impliqués dans la coordination de l'activité locomotrice gauche-droite, et dans la réalisation de mouvement rapide (Goode & Elgar, 2009). Or chez la seiche, *Sof-pax2/5/8* s'exprime dans des territoires nerveux qui sont largement impliqués dans le contrôle moteur : le système nerveux intra-brachial, les masses sous-œsophagiennes antérieure et médiane dérivées des ganglions pédieux qui contrôlent

majoritairement les bras, les ganglions stellaires par où transitent les fibres qui innervent les muscles du manteau et des chromatophores. Ainsi, tout semble indiquer que *Sof-pax2/5/8*, à défaut de délimiter un cerveau « intermédiaire », **joue un rôle majeur dans la spécification du système neuro-musculaire de *S. officinalis***. Il serait intéressant de déterminer, par la suite, si les zones *Sof-pax2/5/8+* au niveau des ganglions stellaires notamment sont les mêmes que les zones *phox2+*, marqueur viscéral moteur dont la présence dans les ganglions stellaires a été relevée par Nomaksteinsky et al. (2013) (Partie I Chapitre 3). Dans le cas d'un non-chevauchement, nous pourrions alors penser à une distribution différentielle des neurones viscéraux vs somatiques.

3- Interprétations

Ces résultats additionnés à des études antérieures mettent en évidence deux grands territoires embryonnaires chez *S. officinalis*, établis dès le début de l'organogenèse (**Fig. 50**) :

- **Une zone cérébrale-optique, *shh+*, *nk2.1+*, *pax6+*, *gsx+*, *otx2+*** et dans une moindre mesure *pax3/7+*. Cette zone s'étend de part et d'autre de la bouche jusqu'aux statocystes, et comprend **les ganglions cérébraux, buccaux et les ganglions optiques**. Dans cette zone, les gènes s'organisent selon les axes bouche-anus et périphérie-centre. De par la présence de la **bouche, des ganglions cérébraux et des gènes *nk2.1*, *otx2* et *pax6***, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il s'agit d'une **région antérieure embryonnaire** ;
-
- **Une zone viscérale-pédieuse (bras-entonnoir-manteau), *pax2/5/8+*, *pax3/7+* et *hox+*** et dans une moindre mesure *pax6+*. Ce territoire comprend **les ganglions viscéraux, pédieux et stellaires** (Lee et al., 2003 ; Hinman et al., 2003). De par la présence de l'**anus et des gènes *hox*** dans cette zone, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il s'agit d'une **région postérieure embryonnaire**.



Zone cérébrale-optique,

Expressions : *otx2+*, *nk2.1+*, *gsx+*, *pax6+*, *pax3/7+*
Ganglions : cérébraux, optiques, buccaux

Zone viscéro-pédieuse,

Expressions : *pax2/5/8+*, *pax6+*, *pax3/7+*, *hox+*
Ganglions : viscéraux, pédieux, stellaires

Figure 50 : Mise en évidence de deux territoires d'après l'expression des gènes de régionalisation médio-latérale et antéro-postérieure. Zones cérébrale-optique (en rouge) et viscéro-pédieuse (en bleu). *a*, anus ; *Ant*, antérieur ; *bo*, bouche ; *Post*, postérieur.

Cette étude moléculaire tend à considérer les bras comme faisant partie intégrante de la zone viscéro-pédieuse. Le recouvrement du tissu céphalique précoce par l'épiderme des piliers des bras est similaire au processus observé durant la métamorphose des gastropodes, chez lesquels l'épiderme en provenance du pied recouvre l'animal (Bonar, 1972, 1976). Ces observations histologiques et moléculaires appuient l'hypothèse d'une origine pédieuse des bras des céphalopodes (Boletzky, 2003), le processus de recouvrement en provenance des tissus des piliers des bras ou du pied illustrant alors une spécificité ontogénique conservée chez les mollusques. **Ainsi les bras semblent présenter des expressions de gènes témoignant la position d'une structure « pied » ancestrale.**

Même si les céphalopodes présentent un développement direct sans étape de métamorphose, il est ainsi possible d'effectuer des parallèles intéressants entre les territoires embryonnaires et les territoires larvaires d'autres mollusques, d'autant plus avec les informations que nous apportent ces études d'expressions géniques. La partie viscéro-pédieuse, qui comprend les ganglions viscéraux, situés dans une région adjacente aux statocystes et les ganglions pédieux, localisés dans la région sous-jacente à l'anus à la base des bras, semblerait davantage être une région homologue à l'hyposphère des larves, qui comprend elle aussi les ganglions sous-œsophagiens et le pied. Avec la présence des ganglions cérébraux et de la bouche, la partie cérébrale-optique de l'embryon de seiche semblerait quant à elle être homologue à l'épisphère des larves trochophores, qui comporte les ganglions cérébraux.

III Régionalisation des yeux et des bras en développement

Après avoir visualisé l'expression de tous ces gènes à l'échelle globale embryonnaire, l'analyse de ces profils d'expressions à des échelles plus locales peut nous apporter des informations supplémentaires concernant le développement de la seiche et sur des conservations potentielles de profils moléculaires. J'ai ainsi mené un premier travail exploratoire sur l'expression des gènes de différenciation et de spécification neurale dans les yeux et dans les bras de l'embryon de *S. officinalis*.

Les yeux des coléoides adultes sont bien décrits, ils se mettent en place *via* un processus de formation d'invagination ectodermique (Mangold, 1989), mais l'histologie de l'œil embryonnaire reste mal connue. Ainsi, si des expressions intéressantes ont été relevées dans les yeux au cours de cette étude préliminaire, il faudra par la suite engager un travail plus fin de microscopie notamment afin de comprendre la dynamique cellulaire du développement des yeux et les couches cellulaires précises concernées par ces expressions. Ce travail n'est pas une étude détaillée histologique du développement de l'œil, mais il peut néanmoins donner un aperçu global de l'expression de ces gènes dans les yeux.

Précédemment, nous avons montré que les bras présentent globalement des marqueurs « postérieurs », comme les territoires du manteau et de l'entonnoir, et tendent à se distinguer de la région cérébrale-optique sur le plan moléculaire. Ces données corroborent donc l'hypothèse d'une origine plus postérieure des bras. De plus, le gène *Sof-pax2/5/8* présente des expressions nettes au niveau du tube de l'entonnoir et de la couronne brachiale, mais pas au niveau de la poche, ce qui pourrait signifier une origine commune de ces deux structures. Outre ces informations de positionnement global, la question se pose de savoir si les profils d'expression des gènes de spécification neurale varient en fonction de la position des bras les uns par rapport aux autres (régionalisation inter-brachiale). Ces gènes ne sont pas connus pour être impliqués dans la mise en place des membres des vertébrés ou des appendices des insectes, et cette étude vise plutôt à déterminer si ces profils d'expression révèlent quelques conservations au niveau intrabrachial qui pourraient s'avérer plus facilement appréhendables qu'à l'échelle globale de l'embryon.

1- Le développement des yeux : entre conservations d'expressions géniques et spécificités moléculaires

Les gènes *msi*, *pax3/7*, *pax6* et *otx2* (Article n°2) s'expriment au niveau des yeux de *S. officinalis* au cours du développement (**Fig. 51**).

Sof-otx2 s'exprime tout au long de l'organogenèse dans les yeux, au niveau des vésicules optiques en phase 1 puis plus précisément au niveau de la rétine en phase 2 (**Fig. 51 B**). Toute la rétine exprime *Sof-otx*, nous observons une zone d'expression plus intense le long de la partie médiane de la rétine. Cette étude est la première à décrire l'expression d'un homologue d'*otx2* dans les yeux d'un mollusque, puisque la seule étude réalisée sur le groupe jusqu'à ce jour portait sur la larve trochophore dépourvue d'yeux de *Patella vulgata* (Nederbragt et al., 2002). En effet les larves trochophores ne comportent pas d'yeux, contrairement aux larves véligères. Chez les autres Lophotrochozoaires en revanche, la présence de transcrit de type *otx2* ont été relevés chez les annélides *H. elegans* et *P. dumerilii* (Arenas-Mena & Wong, 2007 ; Steinmetz et al., 2011), et chez le plathelminthe *D. japonica* (Umesono et al., 1999). Les gènes de la famille *otx2/otd* présentent un rôle extrêmement conservés dans le développement des yeux des vertébrés, convergent avec ceux des céphalopodes (Koike et al., 2007 ; Nishida et al., 2003 ; Viczian et al., 2003), et des structures photoréceptrices des métazoaires en général (Nakanishi et al., 2010 ; Vopalensky & Kozmik, 2009). Chez les vertébrés et *D. melanogaster*, ces gènes sont connus pour réguler la production des molécules d'opsines (Ranade et al., 2008 ; Vopalensky & Kozmik, 2009). Les opsines sont des protéines présentes dans l'ensemble du vivant, qui, en s'associant au rétinol (molécule non protéique, aldéhyde de la vitamine A) constituent la rhodopsine (pigment protéique photosensible). La rhodopsine ou l'opsine ayant été caractérisée dans les yeux de céphalopodes, (Seiche : Bellingham et al., 1998, Mäthger et al., 2010 ; Calmar : Jardón-Valadez et al., 2010 ; Octopus : Paternolli et al., 2009), il est possible que *Sof-otx2* joue un rôle de régulation des opsines dans la rétine de *S. officinalis*.

Le gène *Sof-Pax6* s'exprime dans la vésicule optique dès le début de l'organogenèse. Le gène *pax6/ey* est connu pour jouer comme *otx2/otd* un rôle prépondérant dans la morphogenèse des yeux et des structures photosensibles chez les métazoaires (Callaert et al., 1997 ; Gehring & Ikeo, 1999 ; Kozmik, 2005). Chez les vertébrés, il est impliqué dans le développement des cellules rétinienne (Marquardt et al., 2001), et chez la drosophile il est notamment requis pour la formation des cellules photoréceptrices (Jang et al., 2003). Ainsi, bien que *Sof-pax6*

s'exprime au niveau des yeux il est intéressant de constater qu'il ne s'exprime pas dans la couche rétinienne, contrairement à ce qui est observé chez les insectes et vertébrés, mais à priori dans la cornée et l'iris. Tomarev et al. (1997) et Hartmann et al. (2003) avaient également noté l'absence d'expression de *pax6* dans la rétine de *Loligo* et d'*Euprymna*. De manière étonnante, chez l'annélide *Platynereis*, *pax6* s'exprime dans les « yeux » larvaires, mais ne semble pas impliqué dans la différenciation des photorécepteurs des yeux adultes (Arendt et al., 2002). L'étude de l'expression de *pax6* dans une larve véligère de mollusque nous apporterait des informations supplémentaires sur l'évolution des yeux chez les métazoaires.

De manière étonnante, à aucun moment le **gène *Sof-elav1*** ne s'exprime au niveau des yeux chez *S. officinalis*, contrairement à notre attente d'une expression au niveau des cellules nerveuses rétiniennes. Les gènes *elav* sont pourtant connus pour jouer un rôle dans le développement des yeux chez les métazoaires. Chez la drosophile, une mutation du gène *elav* provoque des malformations des yeux, des électrorétinogrammes défectueux et des défauts de vol (Homyk et al., 1985 ; Campos et al., 1985). Durant le développement, *elav* s'exprime au niveau des organes de Bolwig, structures photoréceptrices de la larve de drosophile (Suzuki & Saigo, 2000), et au niveau des cellules rétiniennes différenciées des yeux en cours de développement (Khan et al., 2013). Chez le Xénope, les gènes de la famille *elav* jouent également un rôle important dans la rétino-genèse (Amato et al., 2005). Si *elav* s'exprime bien dans l'ensemble du système nerveux et sensoriel de l'embryon de seiche, il semble ne pas intervenir dans la différenciation des cellules photoréceptrices. Il serait intéressant de réitérer des expériences d'*HIS* aux stades tardifs d'organogenèse avant l'éclosion.

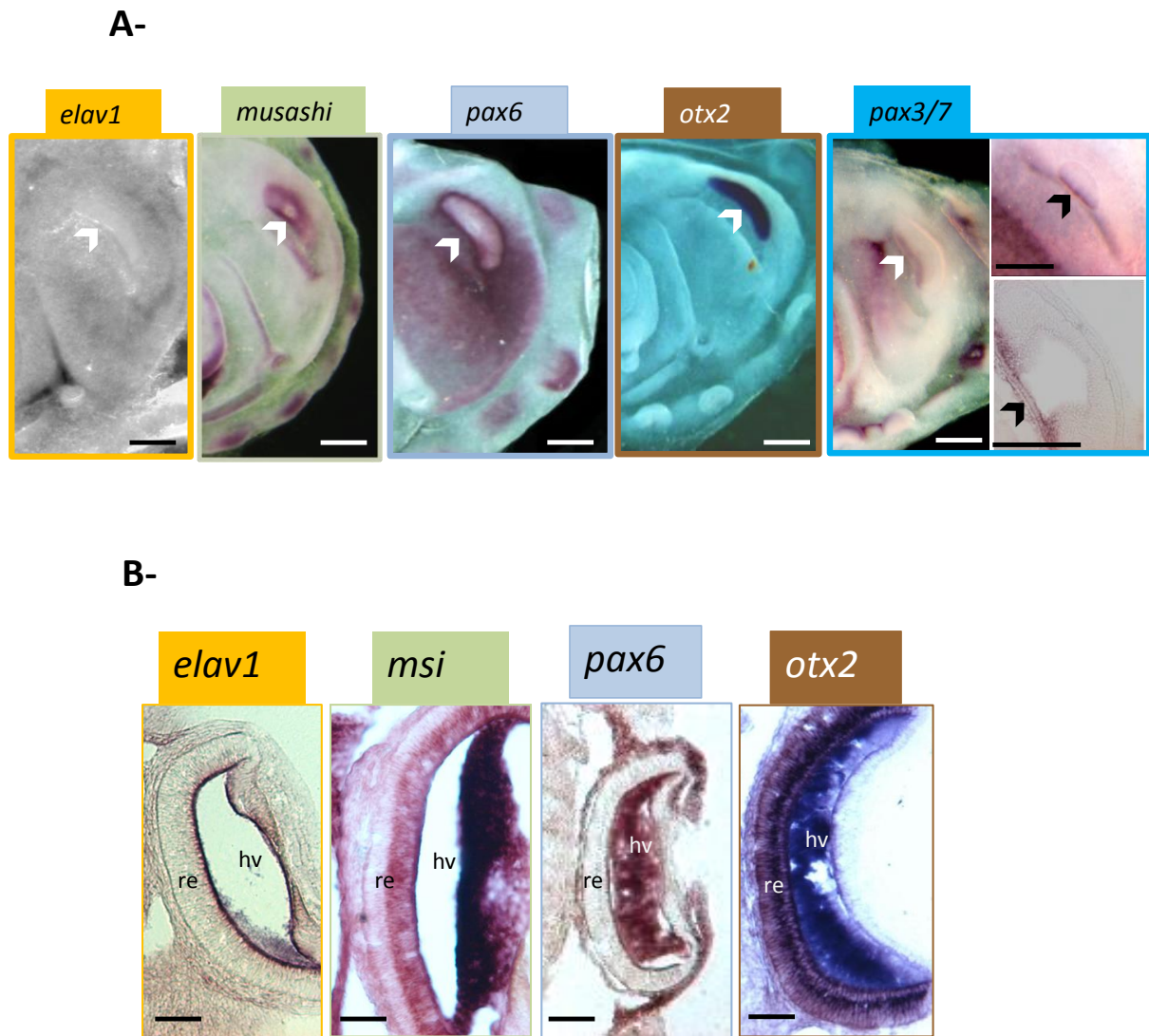


Figure 51 : Expression des gènes de différenciation et de spécification neurale au cours du développement des yeux chez *S. officinalis*. **A**, Côté droit d'embryon en phase plane, les vésicules optiques sont indiquées (têtes de flèches blanches). Pour *pax3/7* est également présenté un grossissement de la vésicule optique avec une section en phase plane, l'expression ne concerne qu'un côté de la vésicule (flèche noire). Echelle : 1mm. **B**, Sections d'yeux d'embryons en phase d'extension. **hv** : humeur vitrée ; **re** : rétine. Echelle : 0.35mm.

Le gène *Sof-msi* en revanche s'exprime clairement au niveau des yeux dès le début de l'organogenèse. Des sections réalisées sur des embryons en phase d'extension révèlent que le marquage se localise clairement au niveau de la rétine, dans la partie la plus externe donc là où se situent les pigments des photorécepteurs rhabdomériques et des corps cellulaires des cellules de soutiens (Mangold, 1989). Chez les vertébrés, *msi1* est retrouvé dans les yeux tout au long du développement et même chez l'adulte. *msi1* s'exprime alors dans de nombreux types cellulaires, incluant des neurones différenciés de la rétine, de ce fait son implication dans les cellules souches de la rétine n'est pas clair (Raji et al., 2007). Il est possible que *Sof-msi* soit largement impliqué dans les mécanismes de développement des yeux chez la seiche, au niveau de cellules neurales variées même différenciées, et ce au détriment du gène *Sof-elav1*. En effet, ces deux gènes sont connus pour réguler différenciellement les étapes de différenciation neurale et présentent des complémentarités d'expression notamment chez les vertébrés (Sakakibara et al., 1996). Cela reste néanmoins très spéculatif.

Le gène *Sof-pax3/7* s'exprime au niveau d'un côté de la vésicule optique de l'embryon en phase 1. Dans cette zone nous visualisons un amincissement de la paroi de l'œil, qui pourrait correspondre à l'emplacement de l'ouverture de la cornée sur le milieu extérieur (Partie I, Chapitre 2). Plus tardivement au cours de l'organogenèse, l'expression de *Sof-pax3/7* au niveau des yeux est plus faible, mais se retrouve néanmoins dans quelques cellules rétinienne. *pax3/7* avait déjà été associé à des fonctions sensorielles chez d'autres espèces. Chez la lamproie par exemple, *pax3/7* est exprimé dans les placodes trigéminales qui forment exclusivement des structures sensorielles (Mc Cauley & Bronner-Fraser, 2002). Chez le poulet, *pax3* s'exprime également au niveau des yeux embryonnaires, plus spécifiquement au niveau de la cornée (Conrad et al., 2009), où il s'exprime dans des cellules de Schwann non myélinisées. Chez la souris, *pax3* est un régulateur clé de la myélinisation du système nerveux périphérique (Kioussi et al., 1995). En effet, il réprime la transcription du gène codant pour la myéline (myelin basic protein, MBP) mais active les gènes marqueurs des cellules de Schwann non myélinisées. Or, ces cellules constituent des récepteurs sensoriels à terminaisons libres, majoritairement situées au niveau des tissus épithélial et conjonctif. Il est donc possible que les gènes *Sof-pax3/7* soient impliqués dans la spécification tissulaire et sensorielle de l'épiderme de l'embryon de seiche, d'où son expression largement épidermique embryonnaire et au niveau des yeux qui sont d'origine ectodermique chez les céphalopodes (Mangold, 1989).

Conclusion

Les expressions des gènes *otx2* et *pax6* dans les yeux de la seiche corroborent les études antérieures stipulant que ces gènes semblent présenter des fonctions extrêmement conservées dans la mise en place des structures photoréceptrices des métazoaires. D'autres gènes sont également retrouvés dans les yeux ou les structures sensorielles d'autres espèces, tels que *msi* ou *pax3/7*. Toutes ces expressions ne sont cependant pas aisées à analyser, et ne peuvent pour l'instant que nous apporter des informations générales de présence de transcrits dans les yeux. Ces données peuvent néanmoins nous apporter des éléments nouveaux utiles pour les études évolutives. C'est notamment le cas de l'expression originale de *pax6*, qui ne semble pas impliqué dans la différenciation des photorécepteurs chez l'embryon des céphalopodes, mais pourrait s'exprimer au niveau des larves véligères de gastropodes. Ces résultats nous apportent également des informations concernant le développement des yeux de la seiche. *elav* ne s'exprime pas dans la rétine, ce qui pose la question des mécanismes régissant la différenciation neurale dans cette structure. *msi*, quant à lui présente une large expression dans la rétine. Finalement, à défaut de nous apporter des éléments de réponses concrets à des questions évolutives ou développementales, ces résultats nous démontrent surtout que des gènes peuvent être impliqués dans divers processus et ne sont pas forcément restreints à un type cellulaire ou à une étape de développement donnée.

2- Le développement des bras, des membres « à part »

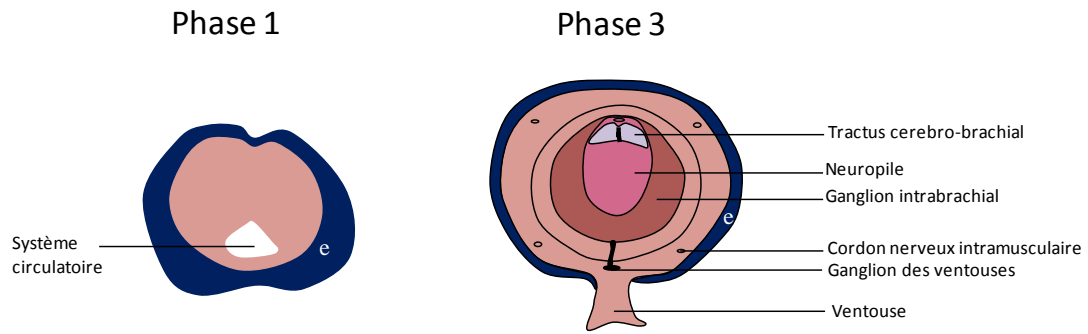
Les 10 bras de la seiche se disposent par paire de part et d'autre de l'axe de symétrie bilatérale. 5 bras sont disposés à droite de l'embryon et 5 bras sont disposés à gauche. Morphologiquement, chaque bras s'organise le long d'un axe proximal-distal, de la base (côté embryon) à l'extrémité de chaque bras. Une face supérieure (le « dessus » du bras) s'oppose à la face inférieure recouverte en partie de ventouses. Au niveau de l'axe de symétrie de chaque bras, je qualifierai de face antérieure celle orientée vers la bouche, quelle que soit le bras ou le côté considéré. D'une même manière, je qualifierai de face postérieure celle orientée vers l'anus.

La **figure 52** résume l'expression des différents gènes dans le bras V gauche à deux stades de développement (avant et après mise en place du SN intrabrachial). Si nous avons choisi d'illustrer le bras V droit, seule l'orientation et donc l'expression antéro-postérieure (orale/anale) aurait été inversée.

Les gènes de spécification ne présentent pas d'expression différentielle en fonction des bras

Concernant les gènes s'exprimant dans la couronne brachiale, cette étude révèle des expressions respectivement similaires pour tous les gènes dans les 5 paires de bras. De précédentes études avaient déjà décrit ce type de répartition identique pour un gène donné le long de la couronne brachiale (Navet et al., 2008 ; Navet et al., 2009). Ainsi ces résultats ne démontrent pas de processus de régionalisation différentielle entre les bras par rapport à leur position sur l'embryon. Cependant chez *Euprymna scolopes* il a été établi des expressions différentielles des gènes *hox* entre les bras (Lee et al., 2003). Cette variabilité d'expression pourrait être en lien avec la position relative des bras les uns par rapport aux autres, ou/et plus globalement par rapport à leur position sur l'embryon, et il est fort probable que l'expression de ces gènes soit similaire chez *S. officinalis*. Des différences de cinétiques d'expression ont notamment été mises en évidence entre les bras, mais les mécanismes à la base de la spécialisation fonctionnelle du bras IV tentaculaire restent non résolus.

Nous n'observons pas de telles différences inter-brachiales dans notre étude.



	<i>elav1</i>	<i>shh</i>	<i>pax2/5/8</i>	<i>pax3/7</i>	<i>pax6</i>	<i>gsx</i>	
bouche ←							→ anus
	trans.	longi.	longi.				

Figure 52 : Expression des gènes de différenciation et de spécification neurale au cours du développement des bras chez *S. officinalis*. En haut, schéma de deux sections de bras en phase 1 et 3. Le tableau récapitule les expressions des gènes dans les bras pour ces deux phases. Pour *pax3/7*, la photo de la phase 3 correspond à la face supérieure d'un bras, contrairement à *pax6* et *gsx* pour lesquels les clichés présentent la face inférieure. *pax6* s'exprime dans les ventouses, *gsx* de part et d'autre.

L'expression des gènes de spécification et de différenciation neurale met en avant l'unicité du système d'un point de vue moléculaire et n'illustre ni l'aspect de positionnement différentiel des bras au sein de la couronne brachiale, ni le phénomène de spécialisation des tentacules, lequel - semblerait-il - ne serait donc pas directement lié à une régulation de ces gènes. Chaque bras peut ainsi être considéré indépendamment au vu de l'expression de ces gènes, et l'homogénéité moléculaire semble corroborer l'origine hypothétique commune et unique des 5 bras.

Le gène *Sof-elav1* nous informe sur la cinétique de différenciation du SN intrabrachial

La première expression du gène *Sof-elav1* dans les bras est observée à partir du stade 22 au niveau des **ganglions intrabrachiaux** puis apparaît dans les **4 cordons intramusculaires** au stade 23. Au stade 30 le **réseau nerveux innervant les ventouses** exprime *elav1*. Cette dernière expression est relativement difficile à visualiser, il est donc possible que le marquage apparaisse plus tôt mais ne soit pas détectable. *Sof-elav1* s'exprime également au niveau des lignes latérales à partir du stade 24 (Partie II Chapitre 1). Plus généralement, *Sof-elav1* est restreint au système nerveux et aux cellules sensorielles chez l'embryon de seiche (Partie II Chapitre 1), ce qui est confirmé ici à l'échelle des bras. Etant donné que les gènes de la famille *elav1* sont connus pour s'exprimer dans les cellules neuronales postmitotiques, nous supposons que l'expression de ***Sof-elav1* nous informe directement sur la cinétique de différenciation spatiale du SN intrabrachial**, comme elle nous informe sur la différenciation neurale du système nerveux et sensoriel de la seiche. Ainsi **les ganglions intrabrachiaux se différencient en premier au stade 21, suivi des cordons intramusculaires au stade 23 et de l'innervation des ventouses en fin d'organogenèse**. Il est intéressant de constater que les **ganglions intrabrachiaux se différencient ainsi après les ganglions pédieux** (stade 20 contre stade 22, Partie II Chapitre 1), qui constituent le centre de commande moteur central des bras. Notons également qu'une coupe transversale d'un embryon en phase 1 ne semble pas révéler la présence d'un système nerveux intrabrachial, qui semble s'organiser en phase 2. Il est donc logique de ne pas retrouver d'expression de *Sof-elav1* à ce stade de développement dans les bras.

Les zones précises d'expression de *Sof-msi* au niveau des bras restent à déterminer.

Le gène *Sof-pax6* semble impliqué dans la mise en place des ventouses

Le gène *Sof-pax6* présente, dès le début de l'organogenèse, une **expression épidermique tout autour de chaque bras**. Au fur et à mesure de la croissance des bras, apparaît une limite d'expression de *Sof-pax6* le long de **l'axe proximal-distal de chaque bras**. Ni la base des bras (donc le côté le plus proximal) ni les piliers des bras n'expriment *Sof-pax6*, ce qui donne après hybridation un aspect « chaussette » sur les bras embryonnaires à partir de la phase 2. Cette « frontière » d'expression tend à s'intensifier avec la croissance des bras. Au stade 23, les ventouses sont mises en place et ne présentent pas d'expression de *Sof-pax6*. Cependant, au stade 28, la tendance s'inverse et c'est la face inférieure qui présente une expression plus intense de *Sof-pax6*, au niveau de **l'épiderme des ventouses**. L'expression de *Sof-pax6* au niveau des ventouses avait déjà été observée chez *Sepia*, *Euprymna* et *Loligo* (Tomarev et al., 1997 ; Hartmann et al., 2003 ; Navet et al., 2009). La zone de recouvrement des bras par *pax6* suivant l'axe proximo-distal correspond à la zone de répartition des ventouses, absentes au niveau proximal. Il est possible que *pax6* soit impliqué dans la mise en place d'une régionalisation face supérieure vs face inférieure, au-delà d'une expression différentielle proximale-distale, en lien direct avec la différenciation des ventouses. *pax6* est connu pour être impliqué dans la mise en place de structures sensorielles chez les métazoaires, et les ventouses comportent justement de nombreux mécanorécepteurs et chémorécepteurs. En plus de la couche épidermique, **les ganglions intrabrachiaux expriment *pax6*** à partir du stade 22, c'est-à-dire **un stade après *Sof-elav1***. Au stade 23 on perçoit clairement la liaison du SN intrabrachial avec le cerveau.

Le gène *Sof-pax3/7* délimite la face ectodermique supérieure des bras et présente une complémentarité d'expression avec *Sof-pax6*

Le gène *Sof-pax3/7* s'exprime **dans la couche d'origine ectodermique** au niveau de la **face supérieure de chaque bras**, tout au long de l'organogenèse. Nous n'observons aucune expression sur la face inférieure où sont les ventouses, quelque soit le stade d'organogenèse considéré. Ainsi, au niveau des bras les territoires d'expression des gènes *Sof-pax3/7* et *Sof-pax6* se chevauchent sur la face supérieure. Au fur et à mesure de l'avancée de l'organogenèse, l'expression épidermique supérieure va légèrement progresser latéralement, sans jamais toutefois entourer totalement le bras. Cette expression ectodermique de *Sof-pax3/7* au niveau

des bras constitue une extension directe avec celle observée au niveau **des piliers des bras**, qui vont finir par recouvrir le tissu céphalique de l'embryon. Cette couche correspond à l'épiderme « final » de l'adulte. Il s'agit d'une couche cellulaire en migration, d'où l'extension latérale du marquage des bras au cours du développement. Plutôt que d'associer ce gène à une expression « dorsale » vs « ventrale » des bras, *Sof-pax3/7* permet de visualiser la dynamique de migration, d'extension et de maturation ectodermique chez *S. officinalis*. Chez les vertébrés, les gènes *pax3-7* s'expriment dans les cellules dérivées des crêtes neurales, comme les mélanocytes et autres cellules pigmentaires (Maczkowiak et al., 2010). Ce marquage restreint à la face supérieure des bras de la seiche pourrait également être lié à la différenciation des chromatophores qui contiennent également des pigments, la face ventouse en étant démunie. De tous les gènes étudiés qui s'expriment au niveau des bras, *Sof-pax3/7* est le seul à ne présenter aucune expression au niveau du système nerveux intrabrachial.

Le gène *Sof-gsx* s'exprime dans des régions adjacentes à *Sof-pax6*

Durant la phase 2, *Sof-gsx* s'exprime tout **autour de la couronne brachiale à la base des bras**. A partir de la phase 3, *Sof-gsx* s'exprime dans les bras dans les **couches latérales sous l'épiderme** (côté antérieur et postérieur) qui s'étend jusqu'à la face inférieure, ventouses non incluses. La face supérieure ne présente pas de marquage. Ainsi, dans le bras, *Sof-gsx* **ne s'exprime pas dans les territoires *Sof-pax3/7+***, comme cela avait déjà été observé au niveau de la région cérébrale-optique. En revanche, *Sof-gsx* s'exprime dans des régions sous-jacentes aux régions *Sof-pax6+* durant la phase 2. En phase 3, *Sof-gsx* s'exprime dans des **régions adjacentes à *Sof-pax6*** lequel s'exprime alors au niveau des ventouses.

Le gène *Sof-pax2/5/8* présente une expression asymétrique suivant l'axe antéro-postérieur des bras

Le gène *Sof-pax2/5/8* s'exprime dès le début de l'organogenèse dans les bras. Alors que les gènes *Sof-pax6*, *Sof-pax3/7* et *Sof-gsx* semblent se régionaliser le long des axes proximo-distal et supérieur-inférieur de chaque bras, *Sof-pax2/5/8* semble se régionaliser le long de l'axe antéro-postérieur. Son **expression est asymétrique** et ne concerne que la **couche mésodermique de la face postérieure de chaque bras**. *shh* au contraire ne s'exprime qu'au

niveau du **côté antérieur** orienté vers la bouche (Navet et al., 2009), alors qu'il est connu pour se répartir du côté postérieur des membres des vertébrés et des insectes notamment au niveau des ailes de drosophile (Morata, 2001). Les gènes *Sof-pax2/5/8* et *Sof-shh* révèlent donc une asymétrie moléculaire antéro-postérieure intrabrachiale. Déjà au niveau morphologique, les bras ont un aspect clairement bilobé au début de l'organogenèse (un lobe antérieur, un lobe postérieur). Il est également intéressant de noter que ces deux gènes s'expriment dans le SN intrabrachial à partir de la phase 2 mais à des niveaux différents : au niveau du **ganglion intrabrachial pour *Sof-pax2/5/8*** contre une **expression au niveau du neuropile central pour *Sof-shh***. *Sof-pax2/5/8* s'exprime au niveau des **piliers des bras dans la couche sous-jacente au territoire *Sof-pax3/7+***. A partir du stade 21 jusqu'au stade 24, l'expression de *Sof-pax2/5/8* s'étend de la face supérieure au côté postérieur dans la région proximale des bras, jusqu'à ne concerner que le côté postérieur dans la région distale, ce qui donne un aspect de « flexion du marquage ».

Résumé des expressions relevées dans les bras et discussion

Au niveau des bras,

- *Sof-elav1* s'exprime exclusivement dans le **système nerveux et le système sensoriel** ;
- *Sof-pax3/7* est restreint à la **couche ectodermique supérieure, également *Sof-pax6+*** ;
- *Sof-pax2/5/8* et *Sof-pax6* présentent une expression « mixte », c'est-à-dire dans des **structures nerveuses (ganglions intrabrachiaux positifs pour les deux gènes) et non nerveuses (origine mésoderme et ectoderme respectivement)**. Ainsi, tous les gènes *pax* s'expriment dans les bras ;
- Les expressions de *Sof-pax2/5/8* et de *Sof-shh* sont **opposées** dans les bourgeons des bras. *Sof-shh* s'exprime dans le neuropile des ganglions intrabrachiaux, contrairement aux gènes *pax*. **Ainsi les expressions de l'ensemble des gènes *pax* et de *shh* ne se superposent jamais au niveau des bras** ;
- *Sof-gsx* s'exprime dans les bras à partir de la phase 2 de développement, une fois que le SN intrabrachial est présent. Il est alors **adjacent aux territoires *Sof-pax6+***.

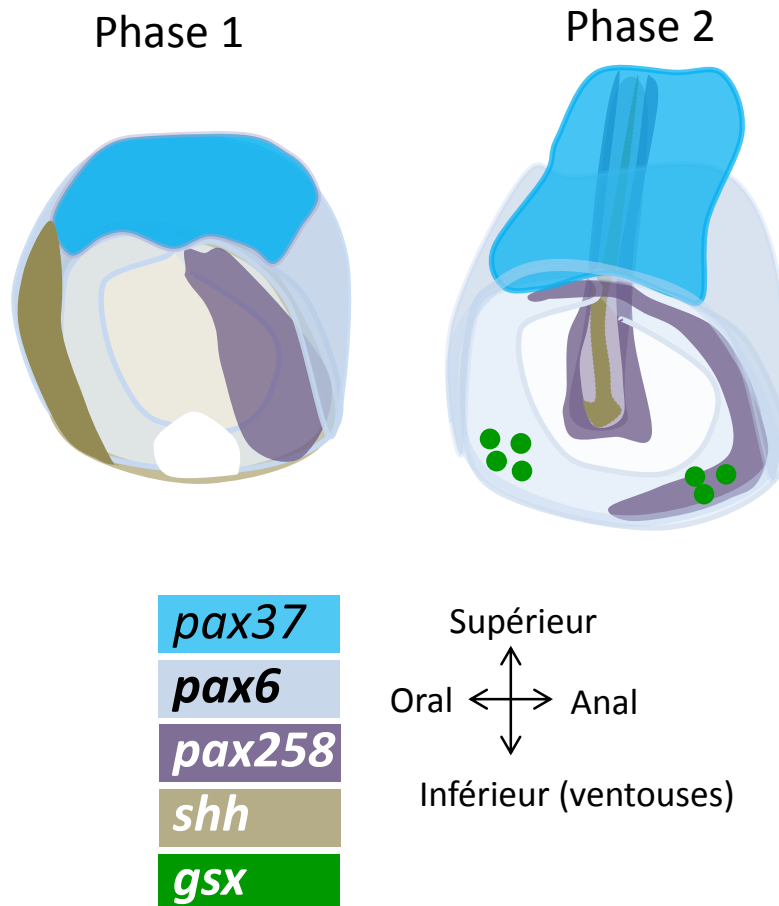


Figure 53 : Synthèse de l'expression des gènes de spécification neurale au cours du développement des bras chez *S. officinalis*.

Des profils d'expressions conservés semblent ainsi exister dans les bras (Fig. 53). En effet, les zones d'expression des gènes *pax* et *shh* ne se chevauchent jamais, contrairement à *pax6* et *pax3/7* par exemple, ce qui est également le cas dans le neuroectoderme des vertébrés. Néanmoins c'est encore en analysant le bras dans son ensemble, et pas seulement la partie nerveuse, que de telles similitudes peuvent être remarquées (Partie II Chapitre 1). En revanche l'expression des gènes de spécification dans les bras ne nous permet pas vraiment d'inférer des hypothèses d'orientation comme à l'échelle embryonnaire, mais semblent être davantage révélatrices de l'aspect fonctionnel. Le profil d'expression du gène *pax6* notamment semble être lié à une fonction sensorielle associée aux ventouses, celui de *pax3/7* à la détermination du tissu épidermique.

Globalement **les profils d'expression de ces gènes à l'échelle des bras reflètent assez bien leurs profils globaux à l'échelle de l'embryon** (Partie II Chapitre 1 et 2). En effet, *Sof-elav1*

est spécifique du SN et du système sensoriel, *Sof-pax3/7* présente une expression très largement ectodermique, *Sof-gsx* présente une expression majoritairement sous-ectodermique similaire à celle relevée au niveau de la région cérébrale-optique, *Sof-pax2/5/8* et *Sof-pax6* enfin semblent présenter des implications dans plusieurs types cellulaires.

Les expressions au niveau des tissus ectodermiques et mésodermiques sont visibles dès la phase 1 et précèdent celles du système nerveux, qui apparaissent toujours au cours de la phase 2. Ce délai peut être lié à la maturation du système nerveux, qui d'après *Sof-elav1* semble se différencier à partir du stade 21 (donc début de phase 2). De plus, une coupe transversale de bourgeon de bras en stade 17 ne semble pas révéler la présence d'un système nerveux intrabrachial (**Fig. 52**), qui s'organiserait donc plus tardivement. Ainsi les gènes *Sof-pax6* et *Sof-pax2/5/8* s'expriment dans le SN intrabrachial déjà organisé qui possèdent vraisemblablement des cellules différenciées. Néanmoins ces gènes peuvent très bien jouer un rôle dans la mise en place du SN intrabrachial, d'autant plus que les couches cellulaires à l'origine de la mise en place du SN dans les bras restent mal connues. De plus, l'expression du gène *pax2/5/8* au niveau des couches mésodermiques pourrait révéler, au-delà d'un processus de différenciation musculaire, une intervention possible dans un processus de maturation du système nerveux intrabrachial. En effet, comme discuté dans le chapitre 2, son expression au niveau du système nerveux de l'embryon pourrait être liée à la mise en place du système de contrôle neuromusculaire, comme cela est déjà connu chez les vertébrés (K. Goode & Elgar, 2009). Ainsi l'expression de *pax2/5/8* observée dans les couches mésodermiques avant l'organisation nerveuse des bras peut être fonctionnellement liée à celles observées au niveau de la masse sous-œsophagienne et des ganglions stellaires (Partie II Chapitre 2).

En conclusion, nous pouvons dire que les gènes de spécification neurale présentent des profils d'expressions qui ne rappellent en rien ce que l'on peut trouver dans les membres de vertébrés ou d'arthropodes et que ces expressions suivent un schéma radial (antéro/postérieur, supérieur/inférieur). Ces expressions soutiennent l'hypothèse d'une origine commune de tous les bras, et ne nous informent pas sur les positions relatives de chaque bras sur l'embryon (hormis la localisation droite/gauche de l'animal). Si les gènes de spécification neurale ne semblent pas être révélateurs d'une orientation intra-brachiale, il est possible de constater que des exclusions de gènes sont conservées comme à l'échelle embryonnaire et de manière similaire aux espèces modèles, et que ces expressions s'avèrent *a posteriori* souvent révélatrices d'une fonctionnalité, même si tout cela reste bien sûr à démontrer.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse a permis d'acquérir de nouveaux éléments majeurs de compréhension de la neurogenèse chez un céphalopode. Il conduit à une approche de la différenciation neurale, de la régionalisation et de l'orientation embryonnaire, et il se replace intégralement dans un contexte plus large d'évolution du système nerveux. Les résultats concernant l'étude de l'expression des gènes de différenciation neurale, en particulier ceux portant sur *elav1*, permettent pour la première fois d'appréhender la dynamique temporelle de différenciation neurale ganglionnaire chez un mollusque. Dorénavant il nous est possible d'estimer l'activation fonctionnelle du SN, et de ce fait d'adopter une terminologie de « ganglion » en adéquation avec des données moléculaires. Le point le plus intéressant qui ressort de cette étude est la mise en évidence d'une dynamique spatiale de différenciation. Le fait que les ganglions cérébraux soient les derniers à présenter des cellules post-mitotiques, nous apporte un premier élément de réponse à la question de l'émergence des spécificités du cerveau des céphalopodes. Bien que les étapes de développement étudiées soient relativement tardives, dans le sens où les déterminations de polarités sont très probablement amorcées depuis longtemps, nous avons pu visualiser les processus de pré- et post-différenciation, ce qui n'était absolument pas certain au départ.

L'étude de l'expression des gènes de spécification apporte également des avancées importantes. En ce qui concerne la question de la régionalisation neurale, ce travail révèle que les ganglions ne présentent pas les mêmes profils moléculaires des gènes de régionalisation en fonction de leur position par rapport à l'œsophage (supra vs sous-œsophagien), ce qui semble appuyer l'idée d'une distinction territoriale entre ces deux types de ganglions. Plus généralement, les ganglions supra-œsophagiens présentent globalement les mêmes marqueurs moléculaires que toute une région comportant la bouche, la région optique et cérébrale (*nk2.1*, *pax6*, *gsx*). Les ganglions sous-œsophagiens présentent des marqueurs communs à toute une région qui regroupe le manteau, les bras et l'entonnoir (*hox*, *pax3/7*, *pax2/5/8*). Avec ce travail, nous sommes donc en mesure de proposer une nouvelle nomenclature morphogénétique des céphalopodes. Ce ne sont pas tant les territoires de céphalopodium et de viscéropalium qui ressortent de ces études aux stades embryonnaires, que les territoires :

- 1) Cérébral-optique, de la bouche aux statocystes, comprenant les ganglions cérébraux, optiques, buccaux, les yeux et entouré d'un tissu céphalique précoce vraisemblablement neurogénique au début du développement ;
- 2) Viscéral-pédieux, avec les bras, le manteau et l'entonnoir, comprenant majoritairement les ganglions pédieux, viscéraux et stellaires.

Le territoire cérébral-optique semble être homologue à la région de l'épisphère des larves des autres mollusques, comportant les ganglions cérébraux et une région apicale, structure nerveuse transitoire qui disparaît au cours de la métamorphose. De la même manière, le tissu céphalique précoce se résorbe en milieu d'organogenèse chez l'embryon de *Sepia*, ce qui pourrait correspondre à un « vestige » ancestral d'un processus métamorphique se déroulant au cours de la phase d'extension.

Le territoire viscéral-pédieux semble être homologue à l'hyposphère des larves, qui comprend le pied, les ganglions pédieux et viscéraux. Si les ganglions semblent présenter un lien fonctionnel étroit avec leurs territoires respectifs (ex. ganglions pédieux près du pied, ganglions viscéraux proches des viscères, ganglions cérébraux proches des afférences sensorielles...), il est fort probable que ces territoires moléculaires traduisent avant tout une spatialisation fonctionnelle, ce qui s'avère être une information capitale dans les réflexions sur l'origine de la centralisation du SN. *pax2/5/8* s'exprime dans le manteau, les bras et le tube de l'entonnoir, mais aussi dans les ganglions pédieux, intrabrachiaux et stellaires, toutes ces structures étant en lien avec un contrôle neuromusculaire en cours de spécification. *nk2.1* s'exprime dans la région cérébrale optique, dans les ganglions cérébraux et buccaux, et cette expression en « arc de cercle » constitue l'exemple le plus parlant d'une distribution territoriale globale des gènes de spécification. Ainsi, bien que le système nerveux des céphalopodes ait atteint un niveau de centralisation très poussé, ces profils d'expressions illustrent parfaitement la sous-fonctionnalisation ganglionnaire ancestrale.

Néanmoins, un point remarquable est que nous constatons qu'au niveau de la région cérébrale-optique, des réseaux moléculaires semblent être conservés, certains profils d'expression de gènes de spécification médio-latérale étant retrouvés chez *Sepia*. Notons le non chevauchement de *shh* et *pax6*, ou la complémentarité entre *nk2.1* et *gsx*, et ce suivant les axes bouches/anus et périphérie/centre de l'embryon. Tous ces profils nous ont conduit à proposer une nouvelle approche des territoires et de l'orientation embryonnaire des céphalopodes, en considérant pour la première fois des données moléculaires, mais également des spécificités développementales

telles que la migration probable du pied des mollusques vers l'avant de l'animal ou le type de développement télolécithe. La **figure 51** récapitule cette approche.

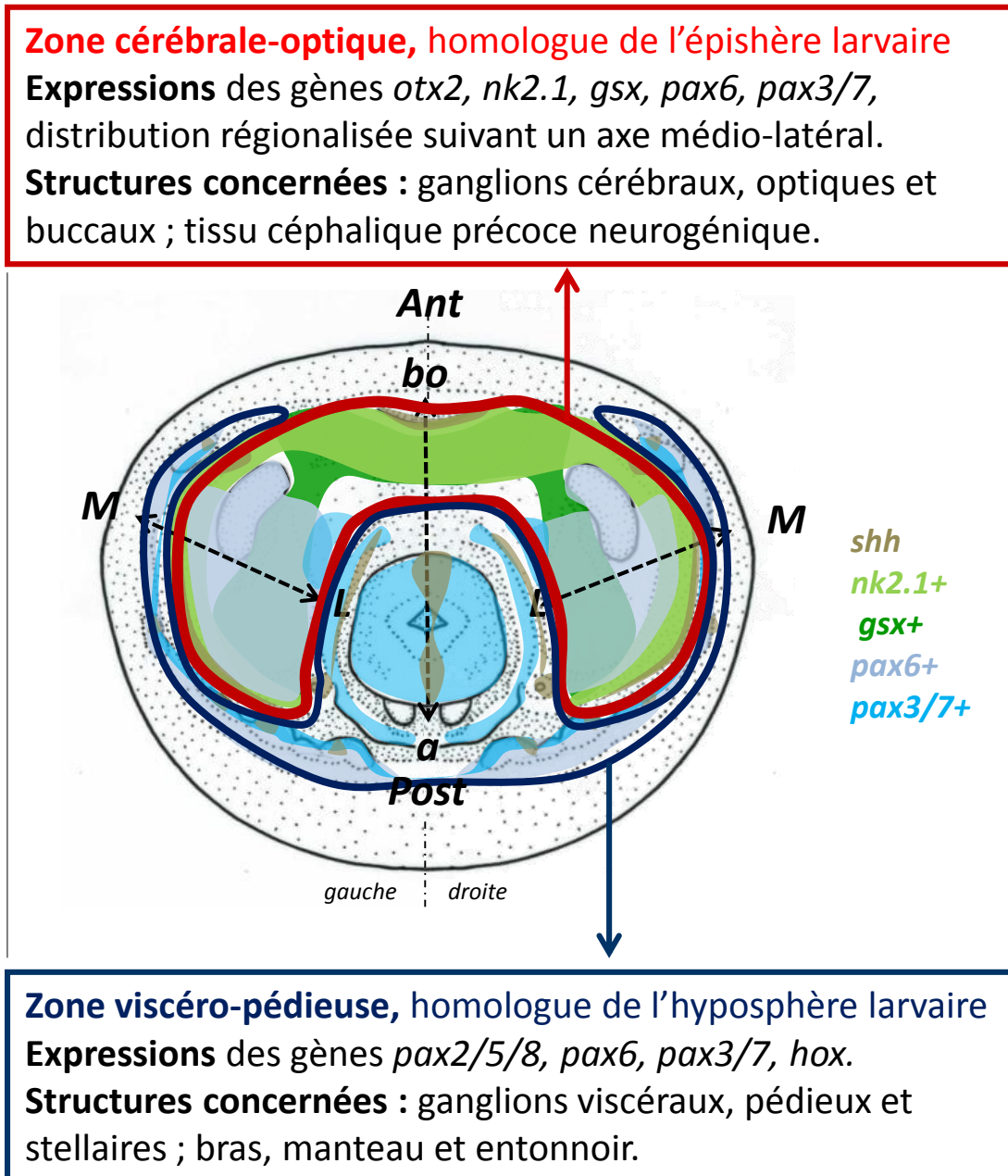


Figure 51 : Schéma récapitulatif de la mise en évidence de deux territoires d'après l'expression des gènes de régionalisation médio-latérale et antéro-postérieure et hypothèse d'orientation embryonnaire. Zones cérébrale-optique (en rouge) et viscérale-pédieuse (en bleu). *a*, anus ; *Ant*, antérieur ; *bo*, bouche ; *L*, latérale ; *M*, médian ; *Post*, postérieur.

Ce type de distribution moléculaire associée à des régions globales embryonnaires ne se retrouve pas chez les vertébrés, insectes et annélides. Les gènes de spécification neurale de ces organismes s'expriment à l'intérieur du cordon ou de la chaîne ganglionnaire nerveuse. Même s'ils sont souvent exprimés dans d'autres organes, ces gènes ne mettent pas en évidence de grands territoires embryonnaires, hormis au niveau du neuroectoderme précoce.

L'une des questions qui se pose justement chez les céphalopodes et les mollusques en général porte sur la délimitation même du neuroectoderme. Finalement, il est possible que l'embryon précoce de seiche présente une large répartition de gènes de détermination neurale, ce qui pourrait expliquer les expressions étendues des gènes de spécification plus tardivement. Afin de tester cette hypothèse, il faudra par la suite étudier l'expression de gènes tels que *bmp* et *sog*, à des stades plus précoces avant l'organogenèse, point qui constitue pour l'heure l'un des défis techniques majeurs qui reste à relever.

Les expressions étendues à des territoires embryonnaires entiers observées chez *Sepia* rappellent notamment les travaux de Lowe et al. (2003) qui démontrent de vastes expressions de gènes de spécification au niveau épidermique chez l'hémichordé *Saccoglossus*. Chez la seiche, c'est *Sof-pax3/7* qui présente une expression majoritairement épidermique, ce qui laisse à penser *a priori* que ce gène n'est pas impliqué dans les processus de spécification neurale. Néanmoins, l'expression épidermique des orthologues de ce gène est retrouvée dans de nombreuses autres espèces, ainsi, chez les vertébrés, les structures nerveuses *pax3-7+* sont les dernières à se délaminer et à s'invaginer pour quitter la couche superficielle neuroectodermique au cours du développement embryonnaire. Si l'on considère le lien étroit rapprochant les processus temporels de l'embryogénèse avec l'évolution, cette dernière observation prend un sens majeur dans une perspective Evo-Dévo.

A des échelles plus locales, l'étude des gènes de différenciation et de spécification neurale révèle également la conservation du recrutement de certains gènes, notamment dans la mise en place des yeux chez les céphalopodes (*otx*, *pax6*), mais aussi des différences étonnantes au cours du développement de ces structures synapomorphes (*pax6* non exprimé dans la rétine, gènes de régionalisation dans les bras avec *shh* côté antérieur, *elav* non retrouvé dans les yeux). Ainsi, il apparaît que si la plupart des gènes de régionalisation présentent des dispositions locales relatives qui rappellent celles que l'on peut observer au niveau global, notamment au niveau des bras, de telles différences illustrent aussi que des structures analogues (yeux, membres...) retrouvées chez de nombreux métazoaires peuvent présenter des différences de régulation moléculaires développementales inattendues.

Mon travail souligne que les similitudes mais également les différences d'expressions de ces gènes de différenciation et de spécification neurale sont aussi instructives dans les questions développementales et évolutives, et mettent notamment en lumière des éléments de réponses aux questions de spécificités du cerveau des céphalopodes et de leur orientation. Mes résultats révèlent que des profils moléculaires semblent être conservés chez *Sepia*, malgré une organisation et un développement dérivés. Ces profils pourraient illustrer des similitudes de profils de spécification neuronale, point qui reste à déterminer par l'étude des sous-types neuronaux. Ainsi ce travail prouve une fois de plus l'intérêt de considérer des organismes à l'organisation dérivée lors des réflexions évolutives et comparées, et place définitivement les céphalopodes comme des organismes modèles dans les études Evo-Dévo.

PARTIE III : MATERIEL ET METHODES

I Conditionnement du matériel biologique

La saison des pontes débute vers avril-mai et se termine vers août-septembre en fonction de la température de l'eau, et d'autres facteurs biotiques/abiotiques. Les œufs de seiche utilisés proviennent de différentes stations marines (Roscoff, UPMC ; Banyuls-sur mer, UPMC, Luc-sur-mer, Université de Caen), et sont issus soit de l'espace côtier (récolte en mer), soit de pontes de seiches femelles en captivité dans les stations. Une fois réceptionnés au muséum, ces œufs sont placés dans un aquarium rempli d'eau de mer naturelle ou artificielle à 35g de sel (Instant Ocean®) par litre d'eau distillée. La température est maintenue aux alentours de 19°C et l'eau est pompée et oxygénée en permanence. Dans ces conditions, le développement se poursuit normalement jusqu'à l'éclosion avec une avancée d'environ un stade par jour. L'estimation des stades se base sur la table de développement établie par Lemaire (1970), qui décrit 30 étapes traduisant l'état de progression de l'embryon dans son cycle avec les caractères associés. En réalisant des prélèvements quotidiens, on peut alors obtenir une collection d'embryons de stades variés, qu'il est possible de stocker après conditionnement ou d'utiliser extemporanément.

Le conditionnement des œufs varie en fonction de leurs utilisations expérimentales. Toutes les procédures sont en accord avec le conseil des communautés Européennes (directive 86/609/CEE) et la loi française (décret 87/848) qui régulent l'expérimentation animale. Les œufs sont placés dans de l'eau de mer filtrée (Steritop™ Merck Millipore 0.22µm). La gangue est ôtée à l'aide d'un scalpel, puis le plus grand nombre de membranes sont ensuite retirées à l'aide de pinces jusqu'à arriver au chorion. Les embryons sont alors placés dans de l'eau de mer filtrée propre, à 4°C pendant 15 minutes pour les endormir, avant d'être déchorionnés. Les embryons utilisés en hybridation *in situ* sont alors fixés dans du paraformaldéhyde (PFA 3,7%) de 2 à 4h en fonction du stade de développement à température ambiante. Le PFA est éliminé par 5 rinçages en PBS1X (tampon phosphate salin, pH 7.4) puis les embryons sont placés dans une solution de PBS1X/Glycérol 30% durant 1h d'imprégnation à 4°C, avant d'être conservés à -20°C. Les embryons servant à l'extraction des ARN totaux sont directement placés après déchorionnage et retrait du vitellus dans du RNAlater®, 24h à 4°C puis conservés à -20°C

II L'hybridation *in situ* ou HIS

La démarche suivie durant ma thèse s'est basée sur la caractérisation de gènes candidats chez la seiche, connus pour intervenir dans les processus de neurogenèse chez les vertébrés et les insectes, et sur l'étude de leur expression durant le développement de *S. officinalis*, grâce à la technique d'hybridation *in situ*. Après le choix des gènes candidats (travail bibliographique), les gènes sont caractérisés dans la banque EST d'ADNc de *S. officinalis* (Génoscope/CEA), couvrant tous les stades d'organogenèse (stades 15 à 30). A partir de la séquence répertoriée, des paires d'amorces spécifiques sont synthétisées afin de pouvoir amplifier le fragment de gène d'intérêt par PCR (polymerase chain reaction). Dans les cas où les gènes candidats ne sont pas retrouvés dans la banque, des amorces dégénérées sont dessinées à partir de la séquence du gène d'intérêt d'autres espèces, phylogénétiquement proches. Après l'étape d'amplification, les fragments de gènes sont clonés, puis une seconde étape d'amplification PCR permet de discriminer le sens d'insertion du fragment dans le plasmide. Une sonde froide ARN complémentaire à l'ARN endogène du gène d'intérêt est ensuite synthétisée, afin de révéler l'expression du gène au cours de l'hybridation *in situ*. Si les gènes s'expriment, les embryons présenteront alors une coloration violette, de par la technique de révélation employée. Les étapes de cette démarche sont détaillées ci-dessous.

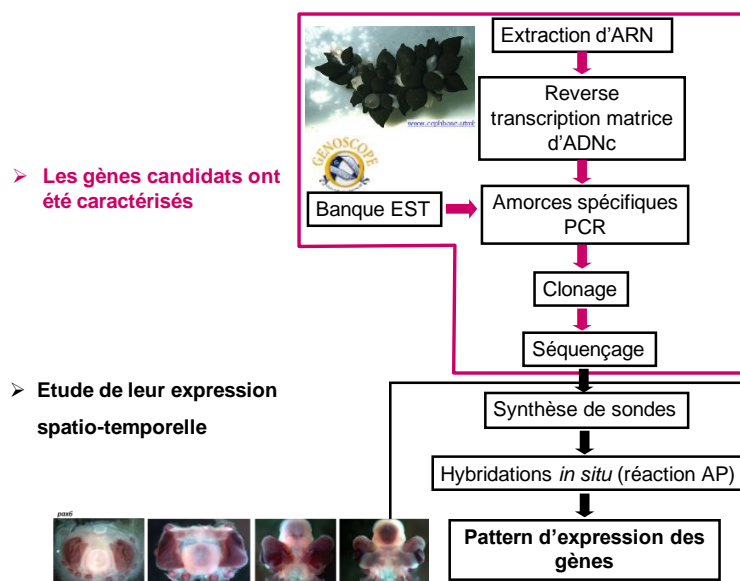


Figure 55 : Schéma récapitulatif des différentes étapes majoritairement utilisées lors de mon travail de thèse.

Extraction des ARN totaux et obtention d'ADN complémentaire

Les ARN totaux sont extraits à partir de tissus lysés d'embryons de *S. officinalis* de stades 15 à 28 au Tri Reagent[®] (MRC, Cincinnati, OH), solution phénolique (Trizol). La solubilité différentielle des molécules aboutit après centrifugation à la formation de 3 phases non miscibles; une phase inférieure phénol/chloroforme, une phase intermédiaire protéique et une phase supérieure aqueuse contenant les ARN totaux, que l'on récupère. Les ARN totaux sont purifiés par un passage sur colonne gDNA Eliminator[®] (QIAGEN, Chatsworth, CA), ce qui permet l'élimination des ADN génomiques. Les ARN sont finalement repris dans de l'eau RNase-DNase free. L'estimation de la concentration des ARN isolés se fait par une lecture de densité optique à 260nm et la vérification de leur état de pureté par calcul du rapport des DO260/280. Ces ARN sont alors reverse-transcrits par l'utilisation du kit Omniscript[®] reverse-transcriptase (QIAGEN, Chatsworth, CA) qui permet de sélectionner les ARN messagers *via* l'utilisation d'amorces oligodT (fixation sur les queues poly-A). Suit l'action de l'ADN polymérase Omniscript[®] RT. Les ADN ainsi obtenus constituent des échantillons d'ADN complémentaires (ADNc), qui vont servir de matrice lors des étapes d'amplification PCR.

Amplification des fragments des gènes d'intérêts par PCR

Des gènes homologues à *otx2*, *elav*, *nk2.1*, *pax6*, *pax3/7*, *pax2/5/8* ont été identifiés dans la banque EST de *S. officinalis*. Des amorces spécifiques Forward et Reverse de 20 pb ont été dessinées pour chaque gène et synthétisées par la société Eurobio. Toutes ces amorces permettent l'amplification de fragments de 350pb à 500pb en fonction des gènes. *gsx* n'a pas été caractérisé dans la banque, nous avons donc dessiné des amorces dégénérées pour ce gène à partir de la séquence de son homologue chez *Euprymna scolopes* (annexe 10). Ces amorces permettent l'amplification de fragments d'environ 300pb et 390pb.

Voici le tableau des réactifs et des concentrations utilisés pour les réactions de PCR, un volume PCR équivaut à 50 µl :

Réactifs	[C] finale	µl/ Volume PCR
H ₂ O stérile	–	37.9
Tampon enzyme 10X	1X	5
MgCl ₂ (25mM)	2mM	4
dNTP mix (20mM)	0.4mM	1
REDTaq® polymérase (5U/µl)	2.5U	0.5
Amorces (100µM)	0.6 µM	0.3/amorce
Matrice ADNc	1E-02µg/µl	1

Les réactifs utilisés – hormis l'eau, les amorces et la matrice – font partie du kit de la polymérase thermostable (REDTaq®, Sigma-Aldrich).

Chaque PCR (Polymerase Chain Reaction), réalisée dans un thermocycler Bio-Rad débute par une étape de dénaturation à haute température (95°C, 5min). Celle-ci permet de déshybrider les ADN, d'homogénéiser le milieu réactionnel et d'activer les polymérases tout en dénaturant d'autres enzymes pouvant être dans la solution.

Dans notre étude tous les programmes sélectionnés ont ensuite effectué 30 fois le cycle PCR décrit ci-dessous (mode hot start):

- Une étape dénaturante : 95°C, 30 secondes
- Une étape d'hybridation des amorces: 58°C, 30 secondes
- Une phase d'élongation permettant aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de l'ADN matrice : 72°C, 1minute

A la fin de ces 30 cycles, la PCR se termine par une phase finale d'élongation de 4 minutes à 72°C.

Les produits PCR sont ensuite visualisés sur un gel d'agarose 1,5% dans du tampon TBE (Tris-Borate 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8). On utilise comme intercalant ADN du SybrSafe® (Invitrogen).

Une fois le fragment du gène d'intérêt amplifié, les produits PCR sont purifiés avec le QIAquick® PCR purification kit (QIAGEN, Chatsworth, CA).

Clonage

Le clonage consiste en l'insertion d'un fragment ADN dans un vecteur bactérien circulaire, au sein de bactéries compétentes dès lors transformées. Chaque bactérie va conduire à la formation d'une colonie de clones. Le clonage permet d'amplifier, d'isoler d'éventuelles différentes formes de produits PCR et d'orienter les fragments, étape nécessaire à la synthèse de sonde. Le séquençage qui suit permet de déterminer dans quel sens le fragment s'est inséré.

Après purification, les amplicons sont insérés dans le plasmide pCR4-TOPO[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA) à température ambiante. Lui-même est introduit par choc thermique (42°C, 30") dans des bactéries compétentes *E. Coli*. Celles-ci vont ensuite être mises en culture sur un milieu de LB Agar (35 g/l) supplémenté en ampicilline (0,5 mg/ml), en IPTG (30 mg/ml, rôle de cofacteur) et en XGal (37,5 mg/ml). Le vecteur confère aux bactéries transformées une résistance à l'antibiotique. De plus, le plasmide est conçu de telles sortes que le produit PCR s'insère au sein de l'opéron lactose, au niveau du gène LacZ codant pour la β -galactosidase. Les bactéries qui intègrent un amplicon, incapable de métaboliser le XGal (formation d'un composé bleu) restent blanches. Les clones sont testés par une PCR utilisant les amorces M13 Reverse (M13R) et Forward (M13F) (Invitrogen, Carlsbad, CA). L'ADN plasmidique est récupéré et purifié à partir de cultures liquides (LB liquide supplémentées en ampicilline 0,5 mg/ml) grâce au kit QIAprep Spin Miniprep[®] de QIAGEN par lyse alcaline. Cette ADN va être séquençé chez GATC Biotech[®] (Konstanz, Germany), à partir du primer M13F contenu dans le plasmide. Si le résultat du séquençage nous donne directement la séquence du gène, l'insertion est qualifiée de directe. Si c'est la séquence complémentaire, l'insertion est dite indirecte. Il arrive que les deux sens d'insertions soient retrouvés dans un clone. L'amplification PCR de l'ADN plasmidique purifié avec les amorces M13F ou M13R du plasmide + Forward ou Reverse du fragment du gène d'intérêt permet de discriminer pleinement les deux configurations. Le produit de cette PCR est purifié (QIAquick[®] PCR purification kit, QIAGEN, Chatsworth, CA), et sert de matrice pour la synthèse de sonde.

Synthèse d'une sonde froide

Une sonde est un oligonucléotide qui va être capable de s'apparier à une séquence cible par complémentarité des bases entre elles. Nous cherchons ici à localiser l'expression d'un gène en visant son ARN messager. Une sonde ARN va donc être synthétisée (kit de transcription Sp6 T7[®] et Dig RNA Labelling mix de Roche, Nutley, NJ). Des bases U sont couplées à la digoxigénine (d'où le terme de sonde froide). Les sites d'initiation des ARN polymérase T3 ou T7 encadrent la séquence d'intérêt à amplifier (**Fig. 56**). Ceci permet la synthèse de sondes sens, dont les séquences sont équivalentes à l'ARN du gène, qui ne pourront donc pas s'hybrider (utiles pour les témoins) et antisens, dont les séquences sont complémentaires à l'ARN endogène. La taille des sondes équivaut à la taille du fragment de gène d'intérêt amplifié (entre les amorces Forward et Reverse) augmentée de 75pb ou 90pb en fonction de l'utilisation de M13F ou M13R respectivement (d'après la carte du pCR4-TOPO, **Fig. 56**). Le choix de l'ARN polymérase se fait en fonction du sens d'insertion et des amorces utilisées.

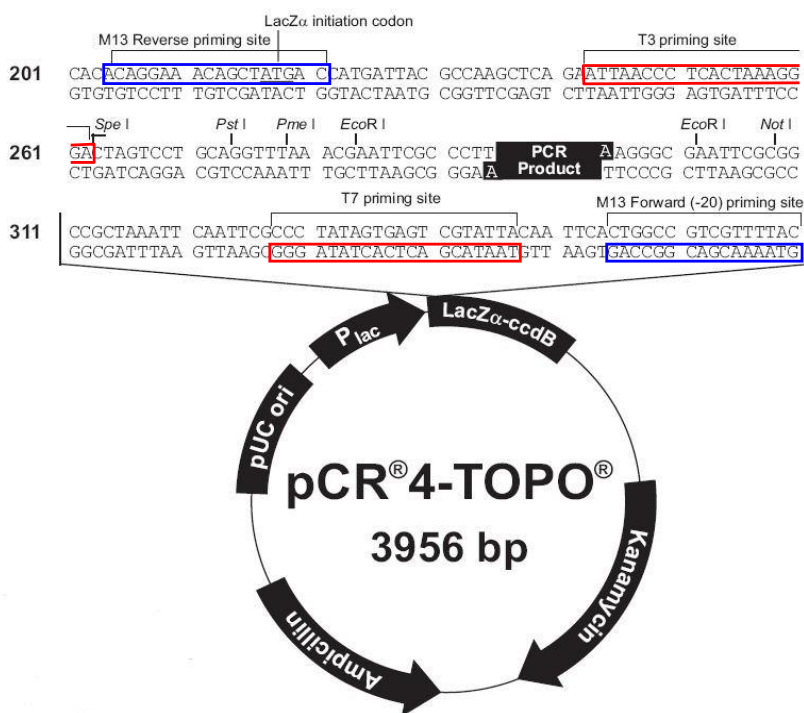


Figure 56 : Représentation schématique du plasmide pCR4-TOPO. pUC ori désigne l'origine de répllication du plasmide. Plac est le promoteur du gène LacZ codant pour la β -galactosidase. Le plasmide possède un gène de résistance à la kanamycine et un gène de résistance à l'ampicilline, utilisé pour la sélection des clones. En bleu : Sites M13 Reverse et M13 Forward encadrant le site d'insertion du produit PCR. En rouge : Sites des couples ARN polymérase utilisés en synthèse de sonde.

	PCR M13F/Reverse	PCR M13F/Forward	PCR M13R/Forward	PCR M13R/Reverse
Insertion directe	OUI	NON	OUI	NON
Synthèse de sondes	+T7 Sonde S	–	+T3 Sonde AS	–
Insertion indirecte	NON	OUI	NON	OUI
Synthèse de sondes	–	+T7 Sonde AS	–	+T3 Sonde Sens

Tableau récapitulatif : Les PCR utilisant les amorces M13F du plasmide/Rreverse du gène et M13R du plasmide/Forward du gène n’amplifieront que les conformations d’insertions directes. L’utilisation des ARN polymérase T7 et T3 permet la synthèse des sondes sens (S) et antisens (AS) respectivement. Les PCR utilisant les amorces M13R du plasmide/Rreverse du gène et M13F du plasmide/Forward du gène n’amplifieront que les conformations d’insertions indirectes. Dans ce cas, l’utilisation des ARN polymérase T7 et T3 permet la synthèse des sondes antisens (AS) et sens (S) respectivement.

Ci-dessous le tableau des réactifs et des concentrations utilisées pour les synthèses de sondes :

Réactifs	[C] finale	µl/ 20µl final
H ₂ O stérile	–	7
Matrice PCR	–	6
Tampon enzyme 10X	1X	2
Dig-labelling mix 10X	1X	2
RNAse Inhibitor (40U/µl)	40U	1
T3ou T7 polymérase (20U/µl)	40U	2

La synthèse se fait entre 2h et 3h à 37°C, puis le plasmide est détruit à la DNaseI à même température. La réaction est arrêtée par un choc thermique à 65°C, 10 minutes. Les sondes ainsi synthétisées vont être purifiées au chlorure de lithium et à l’éthanol absolu froid à -80°C sur une

nuit. Le culot, après être rincé à l'éthanol 70% qui dissout les sels à la surface de l'ADN, est repris dans de l'eau RNase-DNase free. La sonde est réhydratée durant 1 heure environ à 37°C. Une lecture de la densité optique à 260nm et une détermination du rapport de DO260/280 permettent enfin d'estimer la concentration et la pureté des sondes.

Hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* (HIS) est une technique visant à localiser une séquence de nucléotides connue mono-brin (ici ARN endogène). Cette technique repose sur la complémentarité d'une sonde ARN avec notre séquence cible. J'ai majoritairement réalisé des HIS *in toto*, c'est-à-dire que l'hybridation va se faire sur bête entière, et non sur coupes histologiques. Lors des HIS, trois embryons minimum ont été testés par stade, dont un témoin négatif (utilisation de la sonde sens) qui ne présentait pas de marquage à la fin de l'expérience.

Les embryons conditionnés et conservés dans le glycérol 30% sont rincés par plusieurs immersions dans du PTW (Tween20 0,1%, PBS 1X). Les bêtes sont perméabilisées via l'action de protéinase K (10 µg/ml) de 20 à 45 minutes en fonction du stade des embryons. La durée d'incubation va augmenter pour les stades tardifs, plus volumineux et moins fragiles. Les embryons sont ensuite fixés dans du PFA 3,7% durant 1h avant d'être placés dans une solution de préhybridation, composée d'une solution d'hybridation ou SH (formamide 50%, SSC5X, Tween20 1%, SDS 0.5%) additionnée d'héparine (25 µg/ml) et de tRNA (100 µg/ml) pendant 6h à 62°. Le formamide abaisse le Tm des hybrides légitimes (hybrides sonde-cible) ou illégitimes. Il permet ainsi de réaliser l'hybridation dans des conditions moins agressives pour la morphologie du tissu. L'hybridation avec la sonde antisens ou sens pour les témoins (300 ng/ml) va se faire sur une nuit dans un bain d'hybridation (SH, héparine 33 µg/ml, tRNA 400 µg/ml) toujours à 62°C. L'excès de sonde est ensuite éliminé par des rinçages au SH, à 62°C, puis on augmente la stringence en remplaçant progressivement le SH par des bains en concentration croissante de citrate jusqu'au SSC2X à 55°C. Une imprégnation d'une heure dans une solution de RNase A (100 µg/ml) va supprimer les sondes qui ne se sont pas hybridées. Les sites de fixations libres sont saturés 1h à température ambiante dans une solution d'acide maléique ou MABT (NaOH 175 mM, acide maléique 100 mM, NaCl 150 mM pH 7,5, Tween20 1%) supplémentée en FBS 15% et en Blocking Reagent® ou BR 4% (Roche). Des anticorps

anti-digoxigénine couplés à la phosphatase alcaline (Roche, #11093274910), dilués au 1:2000 dans une solution de blocage (MABT, BR 2.4%, FBS 20%) ciblent les uraciles marqués des sondes sur une nuit à 4°C MABT. Les anticorps non hybridés sont éliminés par 6 rinçages de 10 minutes au MABT, puis sur une nuit toujours à 4°C. Les phosphatases endogènes sont inhibées par une solution de tampon AP (Tris pH 9.5 100mM, NaCl 100mM, MgCl₂ 50mM, Tween20 1%) additionnée de levamisol (500µM) durant 15 minutes à température ambiante. La révélation se fait *via* l'ajout du substrat de la phosphatase alcaline, le NBT-BCIP (Roche, #11681451001), dans une solution de tampon AP et de levamisol 1mM (BCIP 2µl/ml, NBT 2µl/ml). La réaction de coloration est stoppée par rinçage dans du PTW puis les embryons sont fixés dans du PFA 3,7% pendant 24h. Les marquages sont analysés à la loupe binoculaire Leica M16 2F.

Coupes cryostat

Afin de visualiser les zones précises des marquages, et dès que les stades le permettent (à partir du stade 18 environ), nous procédons à des inclusions en vue de coupes au cryostat. Les embryons sont alors placés dans un bain de saccharose (tampon phosphate 0,12 M, saccharose 15%), renouvelé 1 fois durant au moins 24h à 4°C. Une imprégnation d'une heure à 37°C dans une solution de gélatine/saccharose (tampon phosphate 0,12 M, saccharose 15%, gélatine 7,5%) précède l'inclusion en blocs des embryons dans cette même solution qui devient rigide à température ambiante. Les blocs sont collés au tissu-teck à des socles de lièges puis plongés dans de l'isopentane à -80°C. Les blocs sont ensuite récupérés et conservés à -80°C avant la coupe. Les coupes cryostat de 20 µm d'épaisseur sont déposées puis montées au Mowiol® (Calbiochem®, #475904) entre lame et lamelles (Mowiol 125g/l, glycérol 300g/l, tampon Tris pH8.5 600ml/l, qsp H₂O). Les observations sont réalisées au microscope Leica. Toutes les photos ont été prises avec une caméra CoolSnapPro (*in toto* et sections), et les contrastes, la luminosité et netteté ont été retouchés sous les logiciels GIMP 2.6 et Helicon Focus 5.3.7.

ARTICLES

ARTICLE 1

Buresi, A., Canali, E., Bonnaud, L., Baratte, S. (2013). Delayed and asynchronous ganglionic maturation during cephalopod neurogenesis as evidenced by Sof-elav1 expression in embryos of *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda). *J Comp Neurol.* 521(7), 1482-1496.

Delayed and Asynchronous Ganglionic Maturation During Cephalopod Neurogenesis as Evidenced by *Sof-elav1* Expression in Embryos of *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda)

Auxane Buresi,^{1,2*} Ester Canali,³ Laure Bonnaud,^{1,4} and Sébastien Baratte^{1,5}

¹Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), DMPA, UMR Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), MNHN CNRS 7208, IRD 207, UPMC, 75005 Paris, France

²Université Paris Pierre et Marie Curie, Paris 6, Paris, France

³Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli, Italy

⁴Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁵Université Paris Sorbonne, Paris 4, Paris France

ABSTRACT

Among the Lophotrochozoa, centralization of the nervous system reaches an exceptional level of complexity in cephalopods, where the typical molluscan ganglia become highly developed and fuse into hierarchized lobes. It is known that ganglionic primordia initially emerge early and simultaneously during cephalopod embryogenesis but no data exist on the process of neuron differentiation in this group. We searched for members of the *elav/hu* family in the cuttlefish *Sepia officinalis*, since they are one of the first genetic markers of postmitotic neural cells. Two paralogs were identified and the expression of the most neural-specific gene, *Sof-elav1*, was characterized during embryogenesis. *Sof-elav1* is expressed in all ganglia at one time of development, which provides the first genetic map of neurogenesis in a cephalopod. Our results unexpectedly revealed that *Sof-elav1* expression

is not similar and not coordinated in all the prospective ganglia. Both palliovisceral ganglia show extensive *Sof-elav1* expression soon after emergence, showing that most of their cells differentiate into neurons at an early stage. On the contrary, other ganglia, and especially both cerebral ganglia that contribute to the main parts of the brain learning centers, show a late extensive *Sof-elav1* expression. These delayed expressions in ganglia suggest that most ganglionic cells retain their proliferative capacities and postpone differentiation. In other molluscs, where a larval nervous system predates the development of the definitive adult nervous system, cerebral ganglia are among the first to mature. Thus, such a difference may constitute a cue in understanding the peculiar brain evolution in cephalopods. *J. Comp. Neurol.* 521:1482–1496, 2013.

© 2012 Wiley Periodicals, Inc.

INDEXING TERMS: neurogenesis; cephalopod; *elav* genes; brain

Intergroup comparisons are essential for understanding neurogenesis and evolution of nervous systems. Two steps are particularly essential in nervous system development: the specification of neural precursor cells and the production of postmitotic neural cells. In vertebrates, precursor neural cells are specified on the dorsal ectoderm; they become internalized as the neural tube invaginates, and then move from the apical to the basal side of the neuroepithelium where their progeny exit the cell cycle and differentiate into neurons (Jacobson and Rao, 2005). In arthropods, precursor cells (or neuroblasts) are localized in the ectoderm, they internalize by ingression

and then their progeny exit the cell cycle generating the central nervous system (CNS; Doe, 1992; Chipman and Stollewerk, 2006). In Lophotrochozoans, and particularly in molluscs, a major group regarding the diversity of nervous system organization, data about CNS development are less numerous. In polychaete annelids, it is known that neurons of the presumptive ventral nerve cord are

*CORRESPONDENCE TO: Auxane Buresi, 55 rue Buffon, CP51 75005 Paris, France. E-mail: buresi@mnhn.fr

Received July 13, 2012; Revised August 27, 2012; Accepted October 2, 2012

DOI 10.1002/cne.23231

Published online July 23, 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

© 2012 Wiley Periodicals, Inc.

produced by local and asymmetrical proliferation from the N teloblast (*Platynereis dumerilii*; Kramer and Weisblat, 1985) and that ectodermic cells internalize by ingression from the anterior ectoderm to form precursor cells of the brain (*Capitella sp.*, Meyer and Seaver, 2009). In molluscs, data are available in only one species, *Aplysia californica*, where neural precursor cells migrate from the epithelial layer and form internalized ganglia (Jacob, 1984). It is not yet known whether this mechanism is conserved in other molluscs, and in particular in cephalopods, whose adult nervous system is highly centralized and directly develops from the embryonic nervous system (i.e., without metamorphosis).

Cephalopods, especially those without any external shell (i.e., all extant species except *Nautilus*), exhibit a complex CNS, extensively described in adults (*Octopus vulgaris*: Young, 1971; *Loligo vulgaris*: Young, 1974; *Sepia officinalis*: Boycott, 1961, *Idiosepius paradoxus*: Shigeno and Yamamoto, 2002). Their brain (CNS) is famous for its high abilities of learning and memorization, and the axons of their peripheral nervous system have been thoroughly studied in electrophysiology (Hodgkin and Huxley, 1952, Grant et al., 2006). Knowledge about neurogenesis in cephalopods is less extensive. Cephalopod embryos develop inside an egg capsule, gastrulate by epiboly, and develop at the animal pole of a large yolky egg (Boletzky et al., 2006). Discrete ganglionic primordia develop from ectodermic placodes at the very beginning of organogenesis (between stage 15 and 16; *Sepioteuthis lessoniana*: Shigeno et al., 2001; *O. vulgaris*: Marquis, 1989; Budelmann, 1995; *I. paradoxus*: Yamamoto et al., 2003). These clusters of embryonic cells are called “ganglia,” although it remains unclear whether they possess differentiated neurons and whether they are functional (Baratte and Bonnaud, 2009). Namely, palliovisceral, pedal, cerebral, or branchial ganglia are shared with other molluscs, while stellate, optic, or intrabrachial ganglia seem cephalopod-specific (ganglionic accumulation phase, Fig. 1A; Marquis, 1989; Shigeno et al., 2001; Yamamoto et al., 2003; Baratte and Bonnaud, 2009). Then, as the embryo spreads out and stretches to adopt the adult morphology some of these ganglia (palliovisceral, pedal, optic, and cerebral) join and form dense connectives and brain lobes (lobe differentiation phase, Fig. 1B; Shigeno et al., 2001; Yamamoto et al., 2003; Wollesen et al., 2010b). Other ganglia (intrabrachial, stellate, and cardiac), together with peripheral sensorial neurons, constitute the peripheral nervous system (PNS). The final differentiation of neurons (both neural circuit formation and neurotransmitter expression) provides a functional nervous system to the young hatched cuttlefish (Fig. 1C; Boycott, 1961).

Studying the nervous system development of cephalopods is not only a developmental but also an evolutionary

issue: first, to understand how such a high degree of nervous system complexity has been reached in comparison to other molluscs; second, to answer the questions relating to developmental homology that raises the unique direct development of cephalopods, whereas most other mollusc species undergo a metamorphosis at one point of their development and often show larval stages. Most of our knowledge about the developing nervous system in cephalopods is inferred from works based on classical histological staining, using Toluidine blue (Yamamoto et al., 2003), hematoxylin (Marquis, 1989), or the Cajal silver method (Shigeno et al., 2001). Others studies performed immunochemistry directed against neuron-specific proteins: namely, against the axon-specific acetylated alpha-tubulin (Baratte and Bonnaud, 2009; Wollesen et al., 2009), against neurotransmitters (FMRFamides: Aroua et al., 2011; Wollesen et al., 2010a, 2012; serotonin: Wollesen et al., 2010b, 2012) and against a neuron-specific enzyme (tyrosin hydroxylase, Baratte and Bonnaud, 2009). Since all these studies characterized only fully differentiated neurons or selected subpopulations of neurons, almost nothing is known in cephalopods about the first steps of neurogenesis, when progenitor cells are specified and when general differentiation occurs. More generally, very few molecular and genetic data are available about cephalopod neurogenesis (Farfan et al., 2009; Navet et al., 2009; Buresi et al., 2012).

In this study we screened for *elav/hu* family members homologs in *S. officinalis*, because in metazoans these genes are among the earliest markers for neural cells as they just exit the cell cycle and start to differentiate into neurons: in *Drosophila* (Campos et al., 1987; Robinow and White, 1991; Berger et al., 2007), in vertebrates (mouse: Sakakibara et al., 1996; Akamatsu et al., 1999; chicken: Wakamatsu and Weston, 1997; zebrafish: Kim et al., 1996; *Xenopus*: Perron et al., 1995; Park et al., 2000), in Lophotrochozoans (*Aplysia*: Yim et al., 2006; *Platynereis*: Denes et al., 2007; *Capitella*: Meyer and Seaver, 2009), and in the cnidarian *Nematostella* (Marlow et al., 2008; Miller and Technau, 2010). Two *elav/hu* homologs have been found in *S. officinalis* and we investigated the expression pattern of the most neural-specific paralog, *Sof-elav1*, in order to assess when ganglionic primordia actually add differentiating neurons. The emergence of gangliogenic territories is known to be synchronized in a short time window (between stages 15 and 16; *Sepioteuthis lessoniana*: Shigeno et al., 2001; *O. vulgaris*: Marquis, 1989; Budelmann, 1995; *I. paradoxus*: Yamamoto et al., 2003), but here in *S. officinalis* we show that prospective ganglia do not exhibit simultaneous and similar expressions of *Sof-elav1*. The palliovisceral ganglia show an extensive and strong expression in very early stages, suggesting that most of their cells become post-mitotic differentiating neurons early. In other ganglia, on

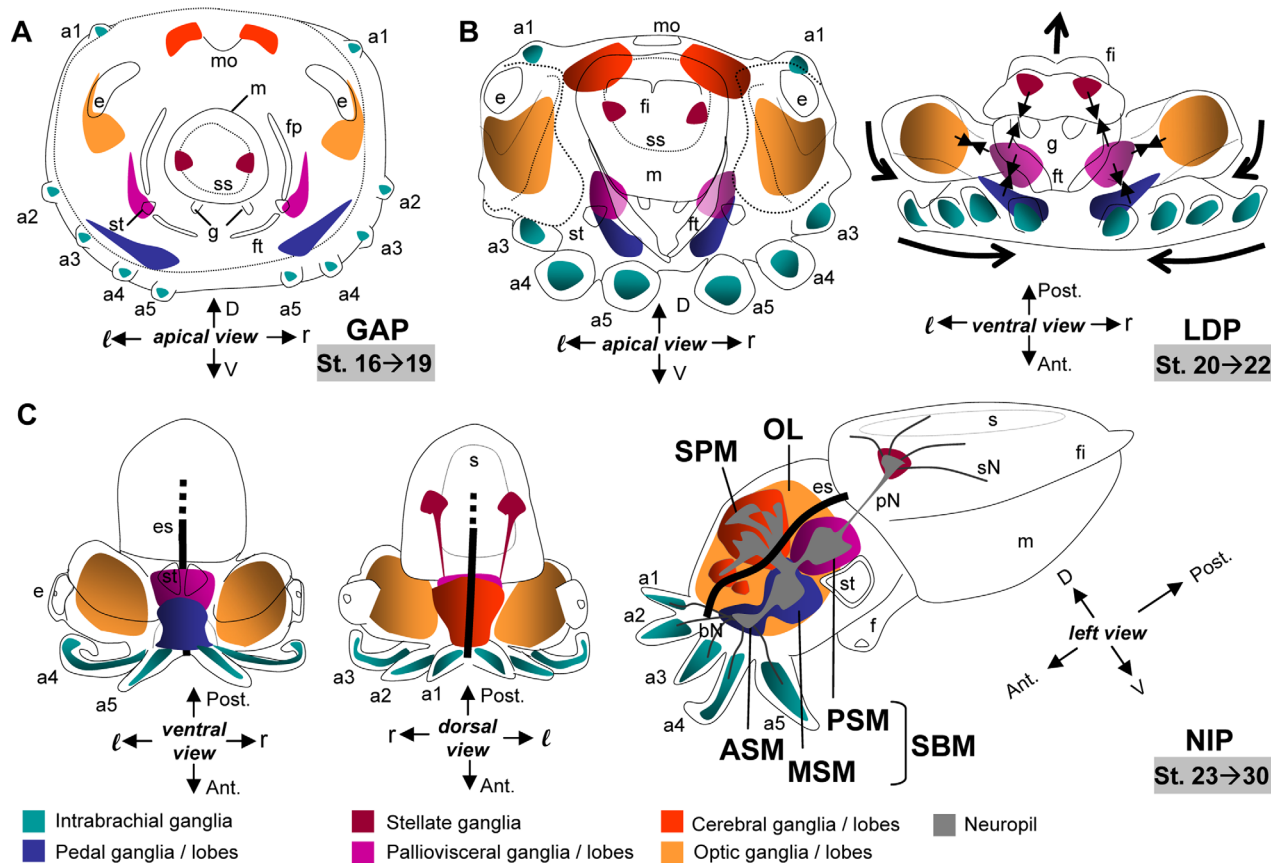


Figure 1. Schematic drawings of the gross nervous anatomy of selected development stages during *S. officinalis* embryogenesis. Developing nervous territories (ganglia and lobes) are deduced from studies in other cephalopods (Marquis, 1989; Shigeno et al., 2001; Yamamoto et al., 2003) and from this study. **A:** Embryo at stage 16, illustrating the “ganglionic accumulation phase” (GAP) in early organogenesis (stages 16–19), when the embryo is shaped as a thin disc on the yolk mass (not shown). **B:** Embryo at stage 21, illustrating the “lobe differentiation phase” (LDP, stages 20–22), when the embryo spreads out (bold arrows) and ganglia of the future brain start connecting with each others (thin arrows). On the left, the apical view of the embryo shows the similar locations of nervous territories as compared with the former phase. On the right, the ventral view reveals how, at this phase, the embryo gains volume and how the different nervous territories actually rise along a future anteroposterior axis from arms to mantle: brachial, pedal, optic-cerebral-palliovisceral, stellate. **C:** Embryo at stage 24 on the left (ventral and dorsal side) and embryo at stage 26 on the right, illustrating the “neuropil increment phase” (NIP, stage 23 to hatching), when the embryo has reached the adult shape and orientation and mainly grow. The lateral view of stage 26 shows how the different “brain ganglia” are now arranged into a supraesophageal brain mass (SPM) including the cerebral ganglion, and a subesophageal brain mass (SBM) including the former pedal and palliovisceral ganglia. a1, a2, a3, a4, and a5: arms 1 to 5; ant: anterior; ASM: anterior subesophageal mass; bN: brachial nerve; D: dorsal side; e: eye; es: esophagus; f: funnel; fi: funnel pouch; ft: funnel tube; g: gills; l: left; m: mantle; mo: mouth; MSM: median subesophageal mass; OL: optic lobe; pN: pallial nerve; Post: posterior; PSM: posterior subesophageal mass; r: right; s: shell; SBM: subesophageal mass; sN: stellate nerve; SPM: supraesophageal mass; ss: shell sac; st: statocyst; V: ventral side.

the contrary, similarly strong *Sof-elav1* expressions only appear in later developmental stages, suggesting that most of their cells retain their proliferative capacities and delay their differentiation. We compare these results with the development of ganglia in other molluscs in order to discuss potential homologies of developmental sequences between species with direct and indirect development. We hypothesize that the delayed maturation of “brain ganglia” in cephalopods may be a first significant cue explaining their higher degree of brain development among molluscs.

MATERIALS AND METHODS

Animal care and staging of embryos

Embryos used in this study were gathered from fertilized egg batches that were collected from the marine station of Luc-sur-mer (France) between April to September. Eggs were kept at 20°C in oxygenated sea water and a sample of them were opened daily to obtain a complete collection of the morphological steps of organogenesis (according to Lemaire’s stage system for *S. officinalis*, 1970). In these conditions, embryos generally took 30 days to grow and developed directly into juveniles inside

a chorion surrounded by numerous dark membranes. These layers were removed in sea water and embryos were fixed for 1 hour in 3.7% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) at room temperature. After stage determination using binoculars, embryos were washed for 5 minutes in PBS (3 times), dehydrated in baths of increasing glycerol concentration, and then stored at -20°C in PBS-glycerol 50%. All animal procedures were in compliance with the guidelines of the European Union (directive 86/609) and the French law (decree 87/848) regulating animal experimentation. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. The terminology used in this article for the phases of CNS development and for the nervous structures in *S. officinalis* are based on the description made in *Sepioteuthis lessoniana* by Shigeno et al. (2001).

Sof-elav1 and Sof-elav2 cloning

Total RNA of *S. officinalis* were extracted from a pool of embryos from stage 15 to 23 using Tri Reagent (MRC, Cincinnati, OH). mRNAs were isolated with the gDNA Eliminator column then converted into cDNA by the omni-script reverse-transcriptase (Qiagen, Chatsworth, CA). Two members of the *elav/hu* family, *Sof-elav1* and *Sof-elav2*, have been characterized in an EST library we generated (Bassaglia et al., 2012) and initial amplification primers for polymerase chain reaction (PCR) were synthesized: for *Sof-elav1*, Forward: 5'-AACTATCTCCACAA ACAAT-3' (NYLPQTM) and Reverse: 5'-GCCCTTTA ATGCTTTCAC-3' (SESIKGA); for *Sof-elav2*, Forward: 5'-AGCCCATGCAAACCCTAAATG-3' (AMQTLN) and Reverse: 5'-GGTTGTTGGGGTCCCTATCT-3' (GPQQP). PCR conditions were: 92°C for 5min + (92°C for 1 minute, 58°C for 1 minute, 72°C for 1 minute) for 40 cycles + 72°C for 4 minutes. They were used to amplify a 346 basepair (bp) fragment of *Sof-elav1* and a 411 bp fragment of *Sof-elav2*. PCR products were cloned into TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) and sequenced by GATC Biotech (Konstanz, Germany), then analyzed with GenBank BLASTn and BLASTx (BLAST, basic local alignment search tool). The analysis of the sequencing confirmed the identity of the fragments.

RNA probe synthesis and hybridization

RNA probes were obtained with the Dig RNA labeling mix kit from Roche (Nutley, NJ). Antisense probe was obtained with T3 polymerase (Roche), from a direct insertion type of the PCR product in the vector, and sense probe for control was obtained with T7 polymerase (Roche). For immunohistochemistry (ISH), at least three embryos from each stage studied were treated and controls were done for each stage. The PBS-glycerol was

removed by successive immersions in PTW (PBS 1 \times , Tween20 0.10%). Embryos were treated by proteinase K in PTW (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20–45 minutes, depending on the stage of the embryos). They were fixed for 1 hour in 3.7% PFA in PTW. A prehybridization step was done in hybridization solution (HS) (formamide 50%, standard saline citrate 5 \times , sodium dodecyl sulfate 0.5%, Tween20 1%) with heparin (33 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and tRNA (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$), for 6 hours at 65°C . Embryos were incubated for 1 night at 65°C in HS with probes (heparin 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, tRNA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Excess probe was eliminated by four rinses (30 minutes, 55°C) in HS and by progressive impregnation in standard saline citrate 2 \times . Embryos were impregnated in MABT (maleic acid 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5, Tween20 1%). Saturation was done in blocking solution (MABT, BB 4% Roche, fetal bovine serum [FBS] 15%, 1 hour, at room temperature), followed by incubation for 1 night at 4°C with anti-digoxigenin antibodies (Roche, #11093274910) coupled to alkaline phosphatase (AP), diluted at 1:2,000 in blocking solution (MABT, BB 2.4%, FBS 20%). Revelation of AP activity was done using NBT-BCIP (Roche), and the reaction was stopped by washing in PTW solution. Embryos were fixed in 3.7% PFA in PBS (24 hours). To visualize internal expressions, embryos were incubated in 15% sucrose, 7.5% gelatin in a phosphate buffer solution 0.12M before being frozen in isopentane at -80°C , and finally cut in 20- μm cryostat sections. Observations were done with a Leica M16 2F binocular stereomicroscope and Leica microscope. Brightness and contrast of photographs were adjusted using Adobe Photoshop 8 software (San Jose, CA). All results reported in this study were observed in a minimum of three specimens per stage. Specimens used for negative controls (dig-labeled sense probe and anti-digoxigenin-AP antibody) did not show any staining.

RESULTS

Elav homologs in *S. officinalis*

A careful search in our *S. officinalis* embryonic EST library (Bassaglia et al., 2012) yielded two putative *elav/hu* homologs, *Sof-elav1* and *Sof-elav2*. *elav/hu* family members are defined by two closely spaced RNA recognition motifs (RRM1-2) followed by a hinge region and then a third RRM (RRM3) (Yim et al., 2006; Samson, 2008). Alignment of *S. officinalis* Elav predicted protein sequences with other Elav/Hu homologs shows this RRM domain structure (Fig. 2A) and neighbor-joining analyses place both putative *S. officinalis* *elav* within a clade that includes other *elav/hu* family members (Fig. 2B). *Sof-elav1* specifically groups within a clade that includes “neurogenic” *elav/hu* family members, together with a very similar *elav* from *O. bimaculoides*. *Sof-elav2* clusters separately with other *elav/hu*

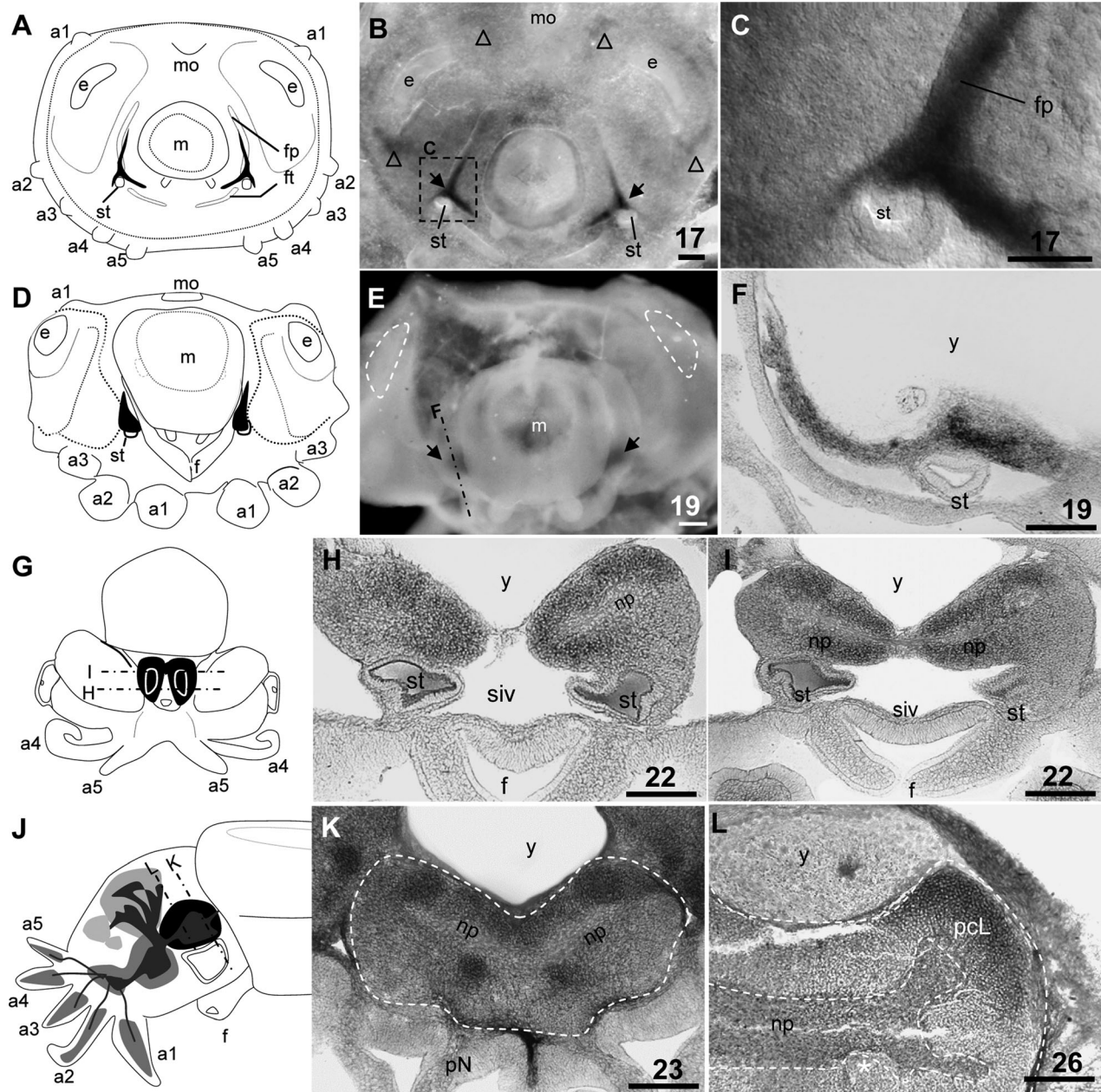


Figure 3. Whole-mount and section views of *Sof-elav1* in situ hybridization in the palliovisceral nervous territories of *S. officinalis* embryos from stage 17 to stage 26 (see the stage number above the scale bar). A–C: *Sof-elav1* expression during the “ganglionic accumulation phase.” A: Schematic representation of B, and C is a focus of B. In B, both palliovisceral ganglia are pointed out by black arrows, open arrowhead respectively underlines the cerebral primordia (up) and the optic primordia (lateral). D–F: *Sof-elav1* expression during the “lobe differentiation phase.” D: Schematic representation of E. In E, both palliovisceral ganglia are pointed out by black arrowheads. F is a section through the left palliovisceral ganglion (see E). G–I: *Sof-elav1* expression during the early “neuropil increment phase.” H,I: Two serial sections through both palliovisceral ganglia-lobes at stages 22–23, as located in G (H: anterior I: posterior). J–L: *Sof-elav1* expression during the late “neuropil increment phase.” K: Median section at stage 23; L is an anterior section at stage 26 showing a *Sof-elav1* expression restricted to the chromatophore lobe. Orientation: for in toto views see Fig. 1; for section views dorsal side is up, ventral side is down. a1, a2, a3, a4 and a5: arms 1 to 5; pcL: posterior chromatophore lobe; e: eye; f: funnel; fp: funnel pouch; ft: funnel tube; m: mantle; mo: mouth; np: neuropil; pN: palleal nerve; siv: ventral sinus; st: statocyst; y: yolk. Scale bars = 200 μ m.

family members (Fig. 2B), which clearly belong to a lophotrochozoan-specific *elav/hu* clade (Samson, 2008; Meyer and Seaver, 2009) and that are less specifically expressed in nervous territories. Both *Sof-elav1* and *Sof-elav2* were

cloned and their expression patterns characterized during *S. officinalis* organogenesis. As expected by phylogenetic analyses, *Sof-elav1* showed the most specific neural pattern and we describe its expression here.

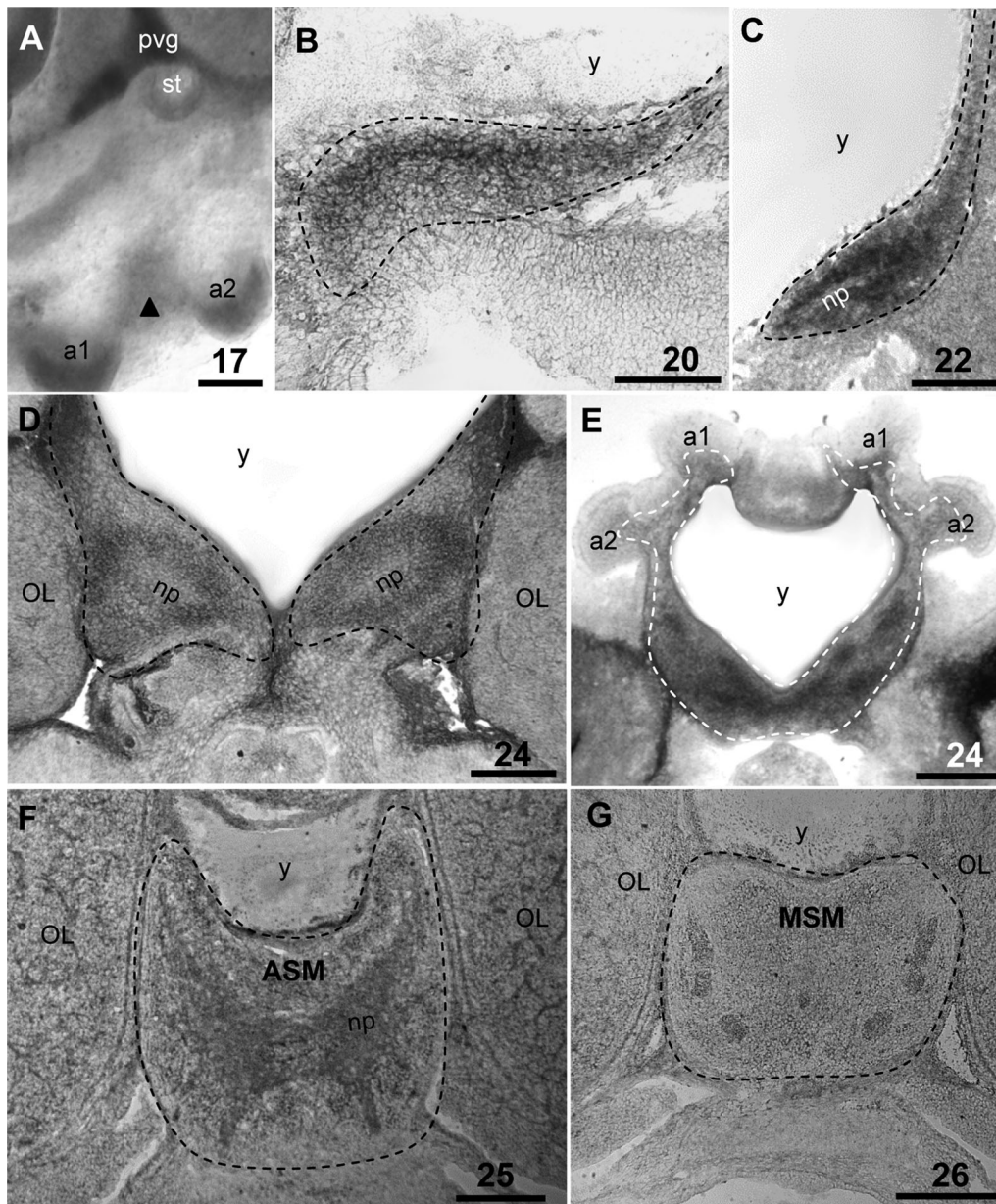


Figure 4. Whole-mount and section views of *Sof-elav1* in situ hybridization in the pedal territories of *S. officinalis* embryos from stage 17 to stage 26 (see the stage number above the scale bar). **A:** Detail of the left pedal area in an embryo at stage 17 (the same as in Fig. 3B), the pedal primordium (black arrowhead) is located between arm1 and arm2 and slightly express *Sof-elav1*. **B:** Sagittal section of the right pedal ganglion at stage 20. **C:** Sagittal section of the right pedal ganglion at stage 22. **D,E:** Transversal section of both pedal ganglia merged as part of the brain subesophageal mass, posterior section corresponding to the MSM (in D), anterior section corresponding to the ASM (in E) with its extension around the arm crown (future interbrachial lobe). **F:** Section through the ASM at stage 25. **G:** Section through the MSM at stage 26. Orientation: for the in toto view see Fig. 1; for section views dorsal side is up, ventral side is down. a1, a2: arms 1 to 2; ASM: anterior subesophageal mass; MSM: median subesophageal mass; np: neuropil; OL: optic lobe; pvg: palliovisceral ganglion; st: statocyst; y: yolk. Scale bars = 200 μ m.

Sof-elav1 in the developing brain of *S. officinalis* embryos **Palliovisceral ganglia**

During the first stages of organogenesis, when ganglionic primordial emerge (stages 15 and 16, see Fig. 1A), both palliovisceral primordia are the only ones showing a

strong *Sof-elav1* expression, clearly detectable in thin sections. At stage 17 they adopt a stellar shape, closely associated with the statocysts and the epidermal folding of the future funnel (Fig. 3A–C). As the embryo enters the lobe differentiation phase (stages 20–22, Fig. 1B), both palliovisceral ganglia adopt a round shape and still

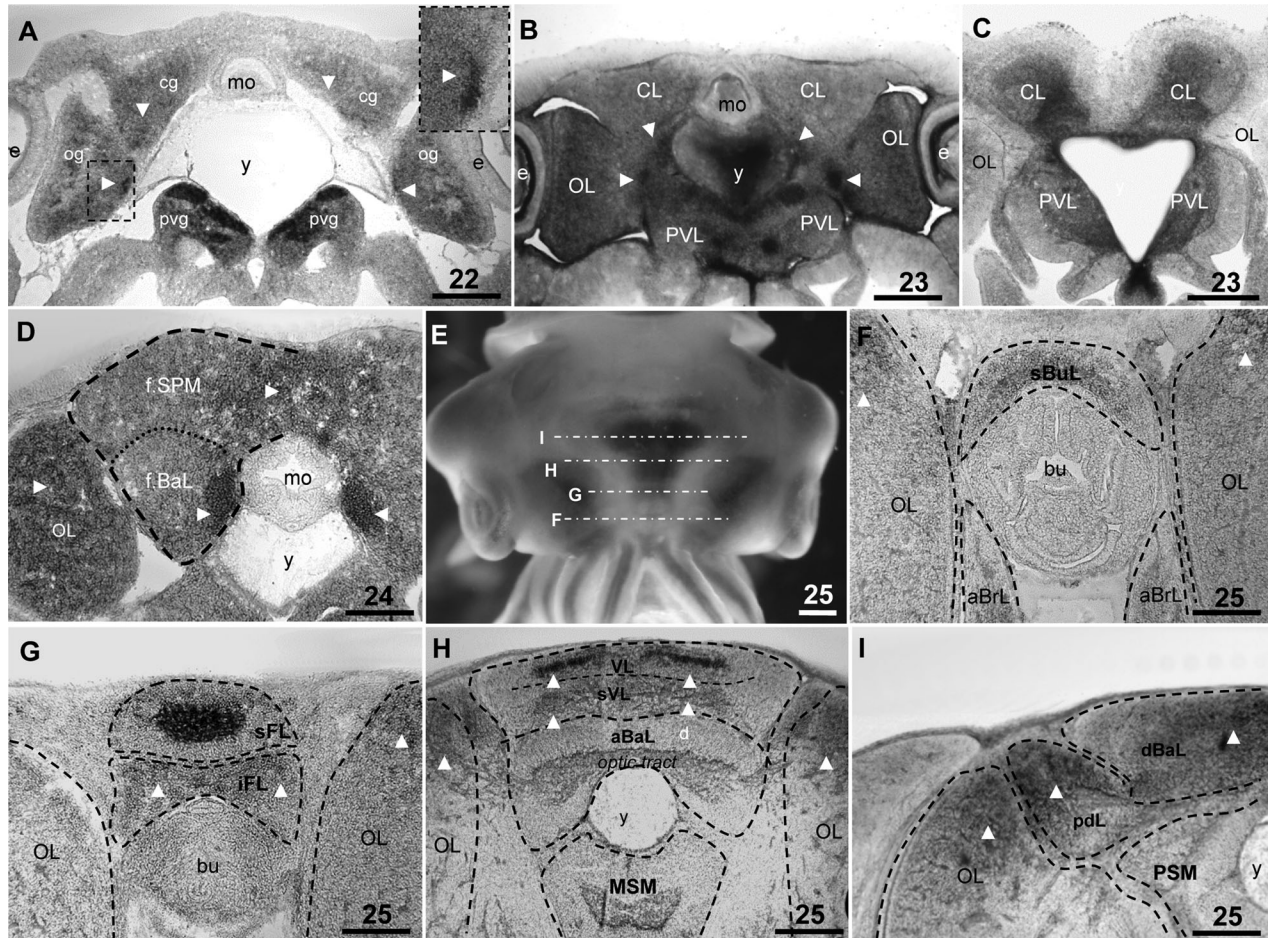


Figure 5. Whole-mount and section views of *Sof-elav1* in situ hybridization in the cerebral and optic territories of *S. officinalis* embryos from stage 22 to stage 25 (see the stage number above the scale bar). **A:** Transversal thin section throughout cerebral and optic ganglia starting expressing *Sof-elav1* at stage 22 (white arrowheads), see insert for strongly positive cells in the left optic ganglion. **B:** Transversal thin section at the eye level, throughout the developing cerebral and optic lobes expressing *Sof-elav1* (white arrowheads) at stage 23. **C:** Transversal thin section posterior to B, throughout the developing cerebral and optic lobes expressing *Sof-elav1* at stage 23. **D:** Transversal thin section throughout the developing brain at stage 24. Stained areas are pointed out by white arrowheads and first delineation of future brain lobes are underlined by dashed lines. **E:** Head of a stage 25 embryo showing *Sof-elav1*-positive areas of the brain, visible under the skin layer. **F–I:** Thin sections from anterior to posterior part of the subesophageal mass at stage 25 (as located in E). Stained areas are pointed out by white arrowheads and brain lobes are underlined by dashed lines. Orientation: for in toto views see Fig. 1; for section views dorsal side is up, ventral side is down. aBaL: anterior basal lobe; aBrL: anterior brachial lobe; bu: buccal mass; cg: cerebral ganglion; CL: cerebral lobe; dBaL: dorsal basal lobe; e: eye; f.BaL: future basal lobe; f.SPM: future supraesophageal mass; iFL: inferior frontal lobe; mo: mouth; MSM: median subesophageal mass; og: optic ganglion; OL: optic lobe; pdL: pedonculate lobe; PSM: posterior subesophageal mass; pvg: palliovisceral ganglion; PVL: palliovisceral lobe; sBuL: supra buccal lobe; sFL: superior frontal lobe; sVL: subvertical lobe; VL: vertical lobe; y: yolk. Scale bars = 200 μ m.

express *Sof-elav1* (Fig. 3D–F). At stage 22, both left and right palliovisceral ganglia come into contact and a common neuropil develops (Fig. 3G–I). During these stages, some lateral parts of these ganglia show unstained cells (Fig. 3H,I). From stages 23–24, the palliovisceral ganglia becomes fully integrated to the subesophageal mass, in a posterior position (it becomes the PSM [posterior subesophageal mass]; see Fig. 1C). *Sof-elav1* expression then get restricted to some differentiating inner lobes of the PSM (Fig. 3J,K) and, from stage 25, the posterior

chromatophore lobe remains as the only lobe of the PSM that still shows a strong *Sof-elav1* expression until hatching (Fig. 3L).

Pedal ganglia

The first *Sof-elav1*-positive cells in both pedal ganglionic primordia appear at stage 20 (Fig. 4B), i.e., four stages after the palliovisceral ganglia. Before stage 20, the pedal primordia are hardly detectable as two slightly stained thickenings between arms 1 and 2 on each side

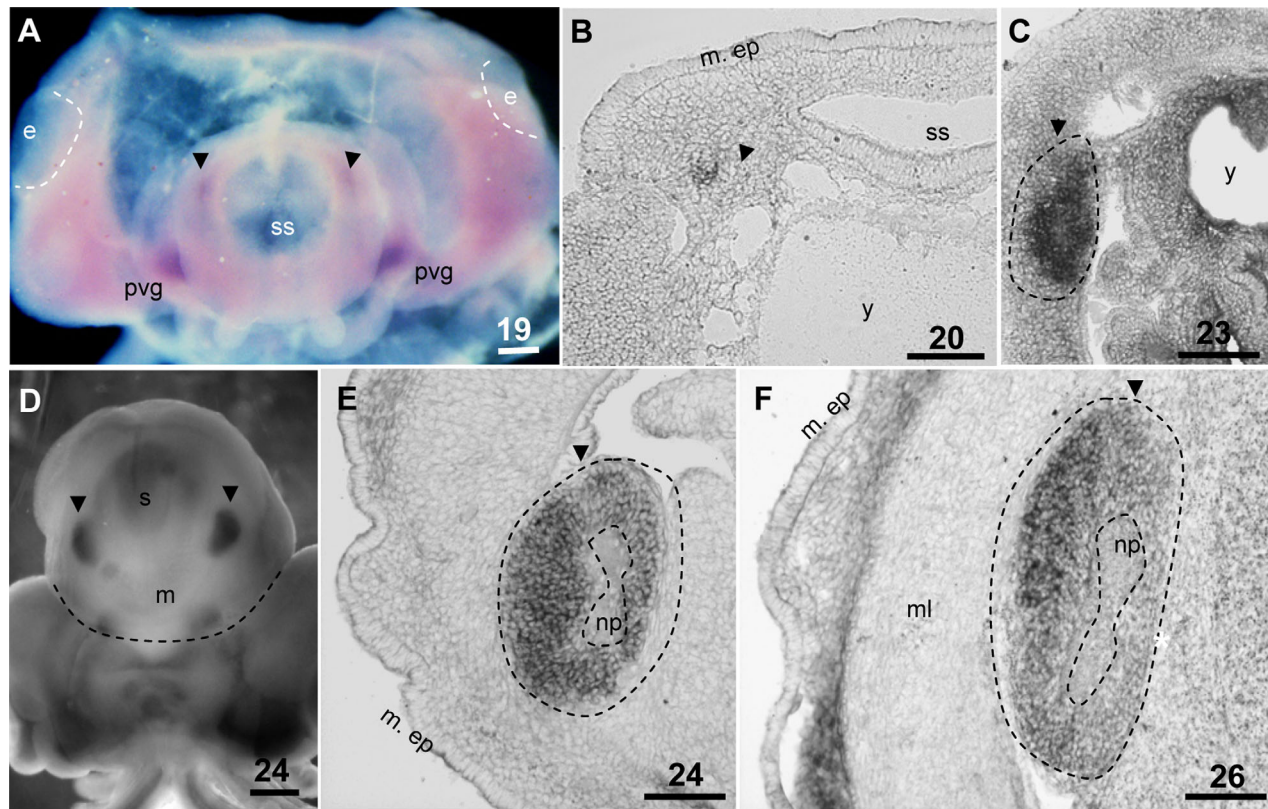


Figure 6. Whole-mount and section views of *Sof-elav1* in situ hybridization in the stellate ganglion territories of *S. officinalis* embryos from stage 19 to stage 26 (see the stage number above the scale bar). Black arrowheads point out the stellate ganglia. Orientation: for in toto views see Fig. 1; for section views dorsal side is up, ventral side is down. e: eye; m: mantle; m.ep: mantle epithelium; ml: muscle layer; np: neuropil; pvg: palliovisceral ganglion; s: shell; ss: shell sac; y: yolk. Scale bars = 200 μ m.

but no strongly positive cells can be detected (Fig. 4A). From stage 20, *Sof-elav1* staining persists until stage 24, when both pedal ganglia converge (Fig. 4C–E), connect, and develop a common neuropil including the arm crown (Fig. 4E). From stage 24 the pedal lobe is fully integrated to the subesophageal mass, in a median position (it becomes both the ASM [anterior subesophageal mass], and the MSM [median subesophageal mass]; see Fig. 1C). During this late developmental step, only sparse *Sof-elav1*-positive cells are observed (Fig. 4F,G).

Optic and cerebral ganglia

The first *Sof-elav1*-positive cells become distinguishable in both optic and cerebral ganglia from stage 22 (Fig. 5A). Before this stage, only slightly stained primordia were visible (see open arrowheads in Fig. 3B). At stage 22 the optic and cerebral ganglia show a global weak staining and only isolated clusters of cells, in front of the yolk mass, show strong expression (Fig. 5A, white arrowheads and inset). At stage 23, cerebral, optic, and palliovisceral ganglia are in close contact and become “brain lobes.” At this time, the level of *Sof-elav1* expression is maximal in all lobes (Fig. 5B,C). At stages 24 and 25 the

cerebral lobe develops and becomes the supraesophageal mass (see Fig. 1C) in which numerous functional lobes start differentiating (Fig. 5D,E). The aim of this study was not to provide an extensive map of the various supraesophageal lobes of the *S. officinalis* embryo. We just show here that they all express *Sof-elav1* at stage 25, and later the buccal lobes (Fig. 5F), the frontal lobes (Fig. 5G), the vertical and subvertical lobes (Fig. 5H), the dorsal basal lobes (Fig. 5H,I), and the pedunculate lobes in the optic tract region (Fig. 5I). After stage 27, the *Sof-elav1* staining becomes harder to detect within the dense nervous tissues of the brain.

Sof-elav1 in the peripheral nervous system of *S. officinalis* embryos

Stellate ganglia

Sof-elav1 expression in cells of both stellate ganglionic primordia starts at around stage 18, on each side of the shell sac, close to the future mantle cavity (Fig. 6A). Hybridizations show that both stellate ganglia first grow as round masses of *Sof-elav1*-positive cells (Fig. 6B–D). Then the neuropil becomes distinguishable at stage 23

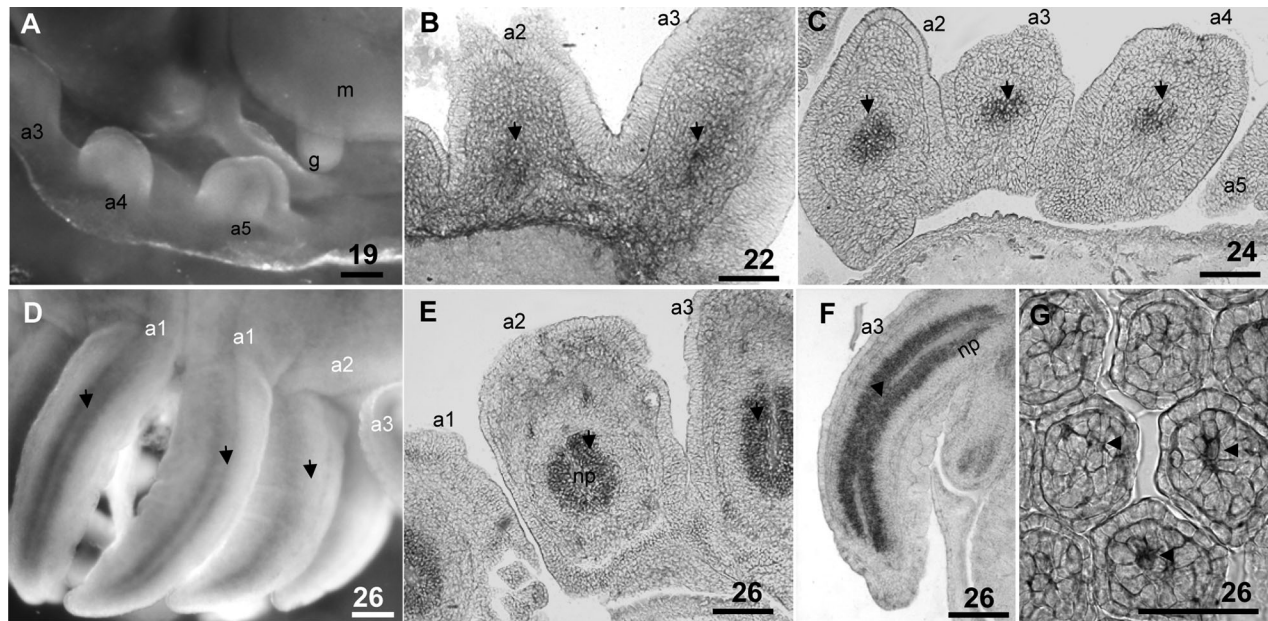


Figure 7. Whole-mount and section views of *Sof-elav1* in situ hybridization in the arms of *S. officinalis* embryos from stage 19 to stage 26 (see the stage number above the scale bar). **A:** Embryo at stage 19 showing no *Sof-elav1* expression in arm buds. **B,C:** Transversal sections through arms at stage 22 (**B**) and 24 (**C**), showing *Sof-elav1* expression in intra-brachial ganglia (black). **D–F:** *Sof-elav1* expression in arms at stage 26 pointed out by black arrows: in toto view (**D**), transversal section (**E**), longitudinal section (**F**), and sagittal section through suckers (**G**). a1, a2, a3, a4 and a5: arms 1 to 5; g: gill; m: mantle; np: neuropil. Scale bars = 200 μ m.

(Fig. 6E) and, from stage 24, some cells inside the ganglia show very weak *Sof-elav1* expression (Fig. 6F).

Intrabrachial ganglia

Within the developing arms the first *Sof-elav1* cells appear at stage 22 (Fig. 7A,B), first as small clusters and, from stage 23, when arms adopt their final cylindrical shape, as a central nervous cord corresponding to the chain of intrabrachial ganglia (Fig. 7C–F). Neuropils become distinguishable from stage 24 (Fig. 7E,F). We did not observe any different result within arms 4, arms that later differentiate into tentacles (longer arms, with suckers only at their extremities). Peripheral primary sensory neurons expressing *Sof-elav1* have been detected within suckers from stage 25 (Fig. 7G).

Peripheral ganglia of the palleal cavity

Regarding the developing palleal cavity, it has been possible to detect both cardiac ganglionic primordia from stage 16 (unstained but visible thickening under the dermis, Fig. 8A, black arrowheads) that expressed *Sof-elav1* at stages 21–22 (Fig. 8B) and until hatching (Fig. 8C). In the presumptive funnel tube territory, two similar thickenings at stage 16 suggested some prospective ganglia (Fig. 8D, open arrowheads). Actually, two symmetrical ganglia were observed later expressing *Sof-elav1* within the funnel muscular tissue (Fig. 8E,F). As far as we know, these two small ganglia have never been described.

DISCUSSION

Two paralogs of the metazoan *elav/hu* family have been found in *S. officinalis*, and one of them, *Sof-elav1*, is specifically expressed in the whole developing nervous system. This result is consistent with data found in other lophotrochozoans, like in the gastropods *Aplysia kurodai* (Yim et al., 2006) and in the annelid *Capitella* sp. where *Capl-elav1* shows the most specific neural pattern while *Capl-elav2* is primarily expressed in the mesoderm (Meyer and Seaver, 2009). Phylogenetic analyses show that an *elav* duplication has probably occurred in Lophotrochozoa that led to a clade made of apparently “less neural specific” paralogs (see Fig. 2 of the present study; Meyer and Seaver, 2009). Since the unique *elav* genes that are known in annelid *Platynereis dumerilii* (Denes et al., 2007) and in the cephalopod *O. bimaculoides* (accession number: FJ861207) are not included in this clade, it is very likely that these species also possess a second *elav* paralog. In *Drosophila*, three *elav* paralogs are known (*elav*, *rbp9*, *fne*). They are essentially present in all neurons throughout development but *elav* is the most precociously expressed gene and the only one for which null mutants are lethal for embryos (Berger et al., 2007; Samson 2008). In vertebrates, genomic duplications have led to four paralogs (HuD, HuC, HuB, HuR in *Homo sapiens*) that may have different roles in neuronal determination and are sequentially expressed (Park et al., 2000).

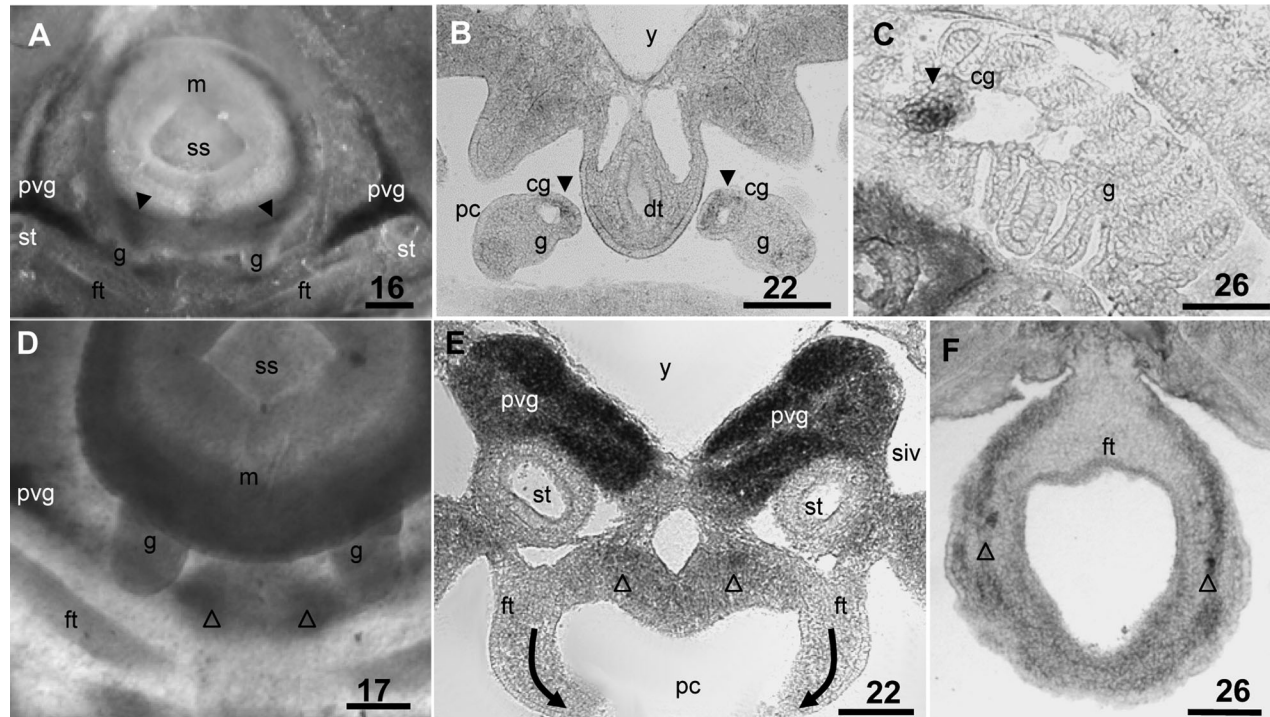


Figure 8. Whole-mount and section views of *Sof-elav1* in situ hybridization in the future pallear cavity area of *S. officinalis* embryos from stage 16 to stage 24 (see the stage number above the scale bar). **A:** At stage 16, *Sof-elav1* expression is detected at the basis of the gills (black arrowheads). **B:** *Sof-elav1*-positive cardiac ganglia at stage 22 (black arrowhead). **C:** *Sof-elav1* positive right cardiac ganglion at stage 26 (black arrowhead). **D:** Pair of slightly stained thickening similar to that of other ganglionic primordia between both funnel tubes at stage 17 (open arrowheads). **E:** Pair of unknown ganglia expressing *Sof-elav1* within the closing funnel tube (arrows illustrate the closure process) at stage 22. **F:** Pair of unknown ganglia expressing *Sof-elav1* within the funnel tube at stage 24. Orientation: for in toto views see Fig. 1; for section views dorsal side is up, ventral side is down. cg: cardiac ganglion; dt: digestive tract; f: funnel; ft: funnel tube; g: gill; m: mantle; pc: pallear cavity; pvg: palliovisceral ganglion; siv: ventral sinus; ss: shell sac; st: statocyst; y: yolk. Scale bars = 200 μ m.

Our study is the first to describe the expression pattern of a “neurogenic-*elav*” during the development of a mollusc. We show that all ganglia and lobes of the nervous system express *Sof-elav1* at some point of their development during embryogenesis: the ganglia of the future brain (palliovisceral, Fig. 3; pedal, Fig. 4; cerebral and optic, Fig. 5) and the ganglia of the peripheral nervous system (stellate, Fig. 6, intrabrachial, Fig. 7, cardiac, Fig. 8). In only one other mollusc species, *Aplysia kurodai*, the expression of the two *elav* paralogs was quantified in adult tissues (by qRT-PCR) and characterized in cultured neurons (Yim et al., 2006) but no data exists about their expression patterns during development, neither in the embryo nor in larvae. Since the neural-specific homologs of *Sof-elav1* in other species (see introduction for references) are all expressed in just-postmitotic neural cells, we can assume that this function is conserved in *S. officinalis* and that the staining we obtained reveals when and where prospective ganglia add such cells. All neurons seem concerned in this *Sof-elav1* requirement and even the future sensory cells, all over the embryo surface (such as those of the skin, of the lateral lines or of the

olfactory organs) express *Sof-elav1* at one point of their development (data not shown, see Fig. 7G for cells in suckers).

One of our main results is that gangliogenic territories do not start *Sof-elav1* expression simultaneously, but at different stages. It has been described, through histological approaches, that cephalopod ganglionic primordia simultaneously emerge at around stages 15–16 from cells that ingress from ectodermic placodes (Shigeno et al., 2001; Yamamoto et al., 2003). In the present study, most primordia were effectively visible as thickening in early stage embryos (open arrows in Figs. 3B, 4A, 8A,D), but the weak staining they showed was insignificant in comparison with the deep staining of both palliovisceral primordia in which positive cells were clearly distinguishable (Fig. 3B,C). Both of these ganglia remain the only ones that show such a strong *Sof-elav1* expression until stage 18, then stellate ganglia, followed by pedal ganglia, and later optic and cerebral ganglia exhibit similar *Sof-elav1*-positive cells. The spatiotemporal pattern of *Sof-elav1* expression is summarized in Figure 9. We interpret these differences as clear evidence that *S. officinalis*

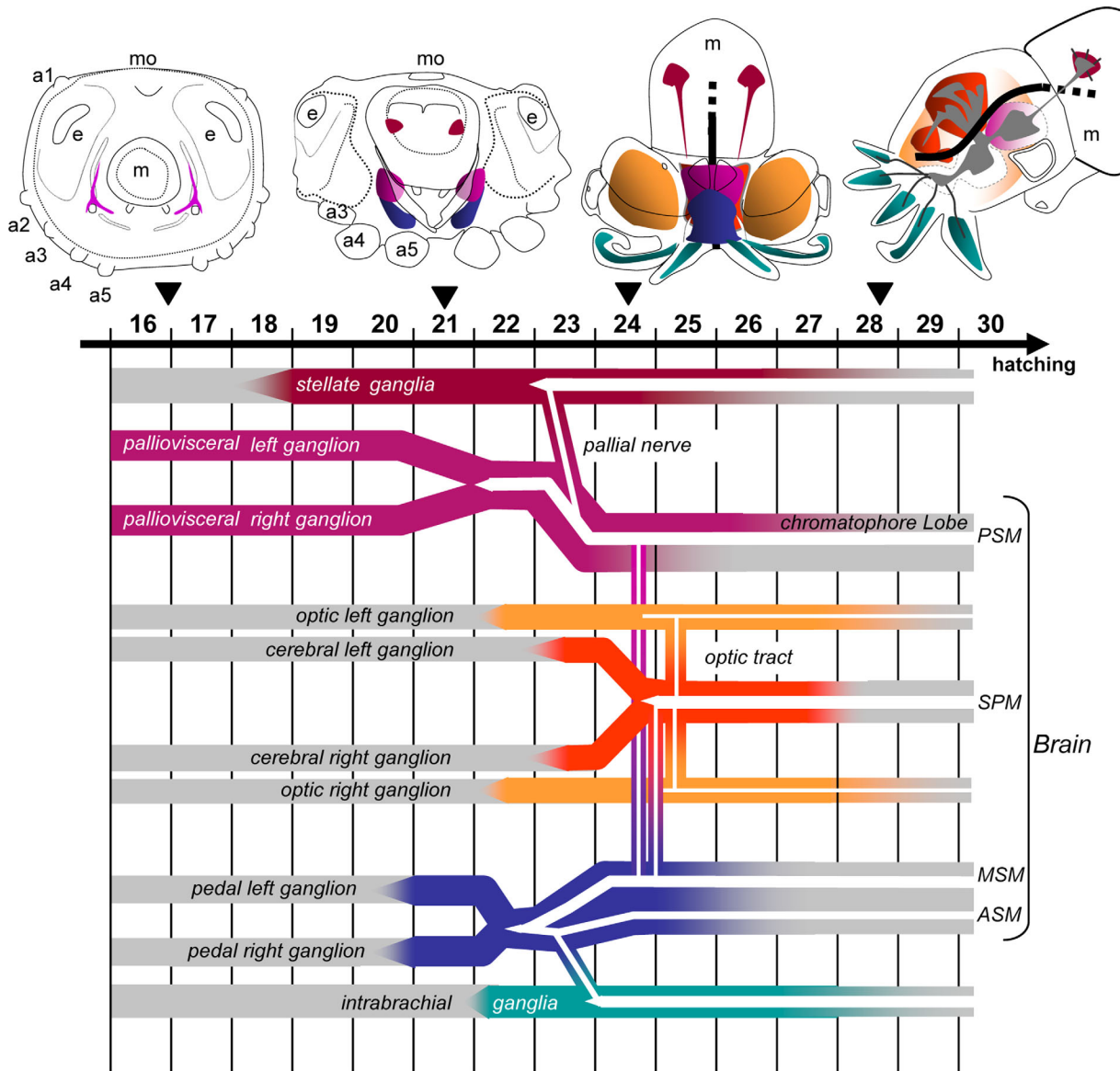


Figure 9. Spatiotemporal map of *Sof-elav1* expression as detected by thin sections of ganglia and lobes during *S. officinalis* organogenesis (from stage 16 to hatching, see above for sketches of embryos). Ganglia/lobes are illustrated by horizontal bars, gray when *Sof-elav1*-negative, or slightly stained and colored when showing clearly distinguishable *Sof-elav1*-positive cells. White inner bars represent neuropil within ganglia or lobes. Fusion and connection of ganglia are illustrated by fusion and connection of bars. Bar widths and distance between bars have no biological meaning. a1, a2, a3, a4, and a5: arms 1 to 5; e: eye; m: mantle; mo: mouth.

ganglia do not mature concomitantly: the neural precursor cells they possess do not differentiate into postmitotic neural cells at the same time. Palliovisceral ganglia start extensive neuron differentiation very early during organogenesis (at stage 16 and maybe before) while other ganglia show numerous positive cells relatively late (e.g., cerebral at stage 25) (Fig. 9). In *Capitella* sp. the first postmitotic neural cells start expressing *Cap1-elav* soon after the ingression of precursor cells from the ectoderm (Meyer and Seaver, 2009). In *S. officinalis* a similar mechanism probably occurs within the palliovisceral ganglia, since their strong *Sof-elav1* expression occurs soon after the

“placode phase.” Concerning the other ganglionic primordia, a weak *Sof-elav1* expression must first concern only a minor part of their cells, since postmitotic differentiated neurons have been observed in most ganglia at around stage 17 (Baratte and Bonnaud, 2009). Most other ganglionic cells certainly keep their proliferative potentials and delay their differentiation into neurons, as confirmed by the delayed *Sof-elav1* expression. Our in situ hybridizations of *Sof-elav1* therefore provide good evidence for a ganglionic “quiescence” in *S. officinalis* and a delayed “adult” neurogenesis, as we expected from former histological observations (Baratte and Bonnaud, 2009).

Another noteworthy result is that *Sof-elav1* expression seems to decrease in ganglia and lobes from the time of its first detection until hatching. After stages 25 and 26, most lobes of the brain only show rare stained cells or a global weak staining (Fig. 9), with the main exception of the posterior chromatophore lobes that keep a high expression level in late stages (Fig. 3L). In most taxa, *elav/hu* members are both involved in neuron differentiation and neuron maintenance (Pascale et al., 2008): in *Drosophila*, where *elav* is expressed specifically in all postmitotic neurons, and is also required for the proper development of young neurons and for the maintenance of mature neurons (Robinow and White, 1991; Pascale et al., 2008), in *Caenorhabditis elegans* (Fujita et al., 1999), and in vertebrates, where the four Hu proteins are specifically expressed in differentiating neurons but also persist in the adult nervous system (Perron et al., 1995; Good, 1995; Kim et al., 1996). In lophotrochozoans, few data are available about late expression of *elav/hu* members but in *Capitella* sp. *Cap1-elav1* shows continued nervous-specific expression after metamorphosis in juveniles. According to the expression levels we observed in *S. officinalis*, we can hypothesize that *Sof-elav1* has mostly a role in neuron differentiation rather than in neuron maintenance. Conversely, it cannot be excluded that neuron maintenance in *S. officinalis* only requires a low level of *Sof-elav1* expression, lower than for neuron differentiation. Concerning the high expression level in chromatophore lobes, a plausible explanation could be that the development of numerous skin chromatophores (structures essentially made of muscular fibers surrounding a central pigmentary cell) requires a concomitant wave of motoneurons differentiation in these lobes (Young 1971, 1974). However, if this reasoning were correct other brain lobes should exhibit a similar strong *Sof-elav1* expression at this time, e.g., ASM and MSM whose neurons target muscular fibers in the developing mantle and arms, which is not the case.

In the past decade, knowledge about nervous development in cephalopods has greatly increased, mostly because of studies relying upon immunochemistry techniques to visualize neurotransmitters (serotonin: Wollesen et al., 2010b, 2012; FMRFamides: Wollesen et al., 2010a, 2012; Aroua et al., 2011; catecholamines: Baratte and Bonnaud, 2009) or nervous-specific histological features like neuropils and axons (using antibodies against alpha-tubulin and phalloidin: Baratte and Bonnaud, 2009; Wollesen et al., 2009). In all these studies, nervous detection and description were de facto based on the existence of already differentiated neurons, expressing neurotransmitters and/or exhibiting axons, and the possibility always exists that some cells are not detected because they do not contain any tested or known epitope. Here, *Sof-elav1* appears as a reliable genetic marker of general

differentiation and this study provides the first map of a cephalopod embryonic nervous system revealed by a genetic marker. Interestingly, our results about ganglionic differential maturation offer new perspectives on recent data. For instance, FMRF-amide expression in *S. officinalis* and *I. notoides* starts very early only in both palliovisceral ganglia (around stage 17, Wollesen et al., 2010a; Aroua et al., 2011), which is consistent with the fact that at this time all other ganglia have very few differentiating or differentiated neurons (Fig. 9). A second concordant observation is that neurotransmitters and neuropils were never detected in other ganglia before stage 21. For instance, in the supraesophageal mass that develops from both “late” cerebral ganglia, FMRFamides appear at stages 25–26 (Wollesen et al., 2010a; Aroua et al., 2011) and serotonin is detectable from stages 24–25 in *I. notoides* and in *O. vulgaris* (Wollesen et al., 2010b, 2012).

Most mollusc species undergo an indirect development and their adult nervous system is described as the complex result of successive gain/loss of different larval/adult nervous components (Croll and Dickinson, 2004; Croll, 2006). The direct development of cephalopods (i.e., the lack of larval stages and metamorphosis) is considered a derived feature and this transition from indirect to direct development is surely as old as the cephalopod group radiation (around 505 MY ago, Young et al., 1998). As a result, comparisons of developmental stages between cephalopod and other molluscan groups (especially gastropods, their sister group) is difficult albeit necessary to understand the evolution of nervous systems. Among gastropods, studies on FMRF and serotonin localization have shown that cerebral ganglia are among the first ganglia to develop, if not the first. In *Ilyanassa obsoleta* and *Haliotis asinina* larvae, cerebral ganglia and pedal ganglia are the first ganglia that develop, followed by the pleural ganglia (Dickinson and Croll, 2003; Hinman et al., 2003). In *Phestilla sibogae* and *Aplysia* sp., cerebral ganglia and pleural ganglia appear first as two cerebropleural ganglia, followed by the pedal ganglia (Marois and Carew, 1997; Croll, 2006). Thus, the precocity of the palliovisceral ganglia we demonstrate in cephalopods with *S. officinalis* has no equivalent in gastropods, even though, given the location of the palliovisceral ganglia just above the statocysts and close to the pedal territory, they may share homology with the gastropod pleural ganglia (R. Croll, pers. comm.). Conversely, the delayed differentiation of the cephalopod cerebral ganglia is unique among molluscs. The cephalopod nervous system is the most highly centralized of all invertebrates and the supraesophageal mass that develops from the cerebral ganglia is mostly responsible for their unique capacities of learning and memorization (Budelmann, 1995; Darmaillacq et al., 2008). A tempting hypothesis therefore emerges:

the delayed differentiation of neurons associated to prolonged proliferative capacities of ganglionic cells is perhaps a fundamental prerequisite for the high degree of brain development of cephalopod hatchlings.

This study is a first genetic approach on early neurogenesis in cephalopods. A more closely focused study including proneural genes (like *achate-scute* homologs, Meyer and Seaver, 2009), genes of neural stem cell maintenance (like *musashi*, Sakakibara et al., 1996), and proliferation assays is now required to describe how progenitor neural cells are specified in cephalopods and what their fates within ganglionic primordia are.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Rousseau for technical assistance in cloning and J. Pasquier for phylogenetic analyses, and J. Henry and L. Dickel (University of Caen), S. Henry, L. Lévêque, and X. Bailly (Roscoff Biology Station – UPMC) for providing biological materials. We also thank Leanne Hardman, Christian Atkinson (Erasmus programme, Univ. Keele/MNHN), and Alex Huillet for helpful English corrections on the article.

CONFLICT OF INTEREST

There are no known conflicts of interest associated with this publication.

ROLE OF AUTHORS

The article has been read and approved by all authors and there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. Further, the order of authors listed in the article has been approved by all of us. All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Acquisition of data: A.B., E.C.; Analysis and interpretation of data: S.B., L.B.; Drafting of the article: L.B., S.B.; Critical revision of the article for important intellectual content: L.B., S.B.

LITERATURE CITED

- Akamatsu W, Okana HJ, Osumi N, Inoue T, Nakamura S, Sakakibara SI, Miura M, Matsuo N, Darnell RB, Okano H. 1999. Mammalian ELAV-like neuronal RNA-binding proteins HuB and HuC promote neuronal development in both the central and the peripheral nervous systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9885–9890.
- 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.
- 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.
- 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.
- Berger C, Renner S, Luer K, Technau GM. 2007. The commonly used marker ELAV is transiently expressed in neuroblasts and glial cells in the *Drosophila* embryonic CNS. *Dev Dyn* 236:3562–3568.
- Boletzky S, Erlwein B, Hofmann DK. 2006. The *Sepia* egg: a showcase of cephalopod embryology. *Vie Milieu Life Environ* 56:191–201.
- Boycott BB. 1961. The functional organization of the brain of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Proc R Soc Lond B* 153: 503–534.
- Budelmann BU. 1995. The cephalopod nervous system: What evolution has made of the molluscan design. In: Breidbach O, Kutsch W, editors. *The nervous system of invertebrates. An evolutionary and comparative approach*. Basel, Switzerland: Birkhauser.
- Buresi A, Baratte S, Da Silva C, Bonnaud L. 2012. *orthodenticle/otx* ortholog expression in the anterior brain and eyes of *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda). *Gene Expr Patterns* 12:109–116.
- Campos AR, Rosen DR, Robinow SN, White K. 1987. Molecular analysis of the locus *elav* in *Drosophila melanogaster*: a gene whose embryonic expression is neural specific. *EMBO J* 6:425–431.
- Chipman AD, Stollewerk A. 2006. Specification of neural precursor identity in the geophilomorph centipede *Strigamia maritima*. *Dev Biol* 290:337–350.
- Croll RP. 2006. Development of embryonic and larval cells containing serotonin, catecholamines, and FMRFamide-related peptides in the gastropod mollusc *Phestilla sibogae*. *Biol Bull* 211:232–247.
- Croll RP, Dickinson AJG. 2004. Form and function of the larval nervous system in molluscs. *Invertebr Repr Dev* 46: 173–187.
- Darmaillacq AS, Lesimple C, Dickel L. 2008. Embryonic visual learning in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Anim Behav* 76: 131–134.
- Denes AS, Jékely G, Steinmetz PR, Raible F, Snyman H, Prud'homme B, Ferrier DE, Balavoine G, Arendt D. 2007. Molecular architecture of annelid nerve cord supports common origin of nervous system centralization in bilateria. *Cell* 129:277–288.
- Dickinson AJ, Croll RP (2003) Development of the larval nervous system of the gastropod *Ilyanassa obsoleta*. *J Comp Neurol* 466:197–218.
- Doe CQ. 1992. Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development* 116:855–863.
- Farfan C, Shigeno S, Nödl MT, De Couet HG. 2009. Developmental expression of *apterous/Lhx2/9* in the sepiolid squid *Euprymna scolopes* supports an ancestral role in neural development. *Evol Dev* 11:354–362.
- Fujita M, Kawano T, Ohta A, Sakamoto H. 1999. Neuronal expression of a *Caenorhabditis elegans* *elav*-like gene and the effect of its ectopic expression. *Biochem Biophys Res Commun* 260:646–652.
- Good PJ. 1995. A conserved family of *elav*-like genes in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4557–4561.
- Grant P, Zheng Y, Pant HC. 2006. Squid (*Loligo pealei*) giant fiber system: a model for studying neurodegeneration and dementia? *Biol Bull* 210:318–333.
- Hinman VF, O'Brien EK, Richards GS, Degnan BM. 2003. Expression of anterior Hox genes during larval development of the gastropod *Haliotis asinina*. *Evol Dev* 5: 508–521.

- Hodgkin AL, Huxley AF. 1952. Ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116:473–496.
- Jacob MH. 1984. Neurogenesis in *Aplysia californica* resembles nervous system formation in vertebrates. *J Neurosci* 4:1225–1239.
- Jacobson M, Rao MS. 2005. *Developmental neurobiology*. New York: Kluwer Academic/Plenum.
- Kim CH, Ueshima E, Muraoka O, Tanaka H, Yeo SY, Huh TL, Miki N. 1996. Zebrafish elav/HuC homologue as a very early neuronal marker. *Neurosci Lett* 216:109–112.
- Kramer AP, Weisblat DA. 1985. Developmental neural kinship groups in the leech. *J Neurosci* 5:388–407.
- Lemaire J. 1970. Table de développement embryonnaire de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Cephalopode). *Bull Soc Zool Fr* 95:773–782.
- Marlow HQ, Srivastava M, Matus DQ, Rokhsar D, Martindale MQ. 2008. Anatomy and development of the nervous system of *Nematostella vectensis*, an anthozoan cnidarian. *Dev neurobiol* 69:235–254.
- Marois R, Carew TJ. 1997. Ontogeny of serotonergic neurons in *Aplysia californica*. *J Comp Neurol* 386:477–490.
- Marquis F. 1989. Die Embryonalentwicklung des Nervensystem von *Octopus vulgaris* Lam. (Cephalopoda, Octopoda), eine histologische Analyse. *Verhandl Naturf Ges Basel* 99: 23–75.
- Meyer NP, Seaver EC. 2009. Neurogenesis in an annelid: characterization of brain neural precursors in the polychaete *Capitella* sp. I. *Dev Biol* 335:237–252.
- Miller DJ, Technau U. 2010. Understanding the evolution of multicellularity: insights from basal metazoans. *BioEssays* 32:175–178.
- 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.
- Park HC, Hong SK, Kim HS, Kim SH, Yoon EJ, Kim CH, Miki N, Huh TL. 2000. Structural comparison of zebrafish Elav/Hu and their differential expressions during neurogenesis. *Neurosci Lett* 279:81–84.
- Pascale A, Amadio M, Quattrone A. 2008. Defining a neuron: neuronal Elav proteins. *Cell Mol Life Sci* 65:128–140.
- Perron M, Théodore L, Wegnez M. 1995. Isolation and embryonic expression of Xel-1, a nervous system-specific *Xenopus* gene related to the elav gene family. *Mech Dev* 51:235–249.
- Robinow S, White K. 1991. Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during *Drosophila melanogaster* development. *J Neurobiol* 22:443–461.
- Sakakibara S, Imai T, Hamaguchi K, Okabe M, Aruga J, Nakajima K, Yasutomi D, Nagata T, Kurihara Y, Uesugi S, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Okano H. 1996. Mouse-Mushashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev Biol* 176:230–242.
- Samson ML. 2008. Rapid functional diversification in the structurally conserved ELAV family of neuronal RNA binding proteins. *BMC Genomics* 9:392.
- 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 larval development of the central nervous system of the loliginid squid *Sepioteuthis lessoniana*. *J Comp Neurol* 437: 449–475.
- Wakamatsu Y, Weston JA. 1997. Sequential expression and role of Hu RNA-binding proteins during neurogenesis. *Development* 124:3449–3460.
- Wollesen T, Loesel R, Wanninger A. 2009. Pygmy squid and giant brains: Mapping the complex cephalopod CNS by phalloidin staining of vibratome and whole-mount preparations. *J Neurosci Methods* 179:63–67.
- Wollesen T, Cummins SF, Degnan BM, Wanninger A. 2010a. FMRamide gene and peptide expression during central nervous system development of the cephalopod mollusk, *Idiosepius notoides*. *Evol Dev* 12:113–130.
- Wollesen T, Degnan BM, Wanninger A. 2010b. Expression of serotonin (5-HT) during CNS development of the cephalopod mollusk, *Idiosepius notoides*. *Cell Tissue Res* 342: 161–178.
- Wollesen T, Sukhsangchan C, Seixas P, Nabhitabhata J, Wanninger A. 2012. Analysis of neurotransmitter distribution in brain development of benthic and pelagic octopod cephalopods. *J Morphol* 273:776–790.
- Yamamoto M, Shimazaki Y, Shigeno S. 2003. Atlas of the embryonic brain in the pygmy squid, *Idiosepius paradoxus*. *Zool Sci* 20:163–179.
- Yim SJ, Lee YS, Lee JA, Chang DJ, Han JH, Kim H, Park H, Jun H, Kim VN, Kaang BK. 2006. Regulation of ApC/EBP mRNA by the *Aplysia* AU-rich element-binding protein, ApELAV, and its effects on 5-hydroxytryptamine-induced long-term facilitation. *J Neurochem* 98:420–429.
- Young JZ. 1971. *The anatomy of the nervous system of Octopus vulgaris*. Oxford, UK: Clarendon Press.
- Young JZ. 1974. The central nervous system of *Loligo*. I. The optic lobe. *Philos Trans R Soc Lond B* 67:263–302.
- Young RE, Vecchione M, Donovan DT. 1998. The evolution of coleoid cephalopods and their present biodiversity and ecology. In: Payne AIL, Lipinski MR, Clark MR, Roeleveld MAC, editors. *Cephalopod biodiversity, ecology and evolution*. *S Afr J Mar Sci* 20:393–420.

ARTICLE 2

Buresi, A., Baratte, S., Da Silva, C., Bonnaud, L. (2012). orthodenticle/otx ortholog expression in the anterior brain and eyes of *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda). *Gene Expr Patterns*. 12(3-4), 109-116.



orthodenticle/otx ortholog expression in the anterior brain and eyes of *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda)

Auxane Buresi^{a,*}, Sébastien Baratte^{a,b}, Corinne Da Silva^c, Laure Bonnaud^{a,d}

^a 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

^b Université Paris Sorbonne, Paris 4, France

^c CEA – GENOSCOPE, Evry, France

^d Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 October 2011

Received in revised form 8 February 2012

Accepted 9 February 2012

Available online 18 February 2012

Keywords:

Sepia officinalis

Development

otx2

Brain regionalization

Eyes

ABSTRACT

The origin of cerebral structures is a major issue in both developmental and evolutionary biology. Among Lophotrochozoans, cephalopods present both a derived nervous system and an original body plan, therefore they constitute a key model to study the evolution of nervous system and molecular processes that control the neural organization. We characterized a partial sequence of an ortholog of *otx2* in *Sepia officinalis* embryos, a gene specific to the anterior nervous system and eye development. By *in situ* hybridization, we assessed the expression pattern of *otx2* during *S. officinalis* organogenesis and we showed that *otx* is expressed (1) in the eyes, from early to late developmental stages as observed in other species (2) in the nervous system during late developmental stages. The *otx* ortholog does not appear to be required for the precocious emergence of the nervous ganglia in cephalopods and is later expressed only in the most anterior ganglia of the future brain. Finally, *otx* expression becomes restricted to localized part of the brain, where it could be involved in the functional specification of the central nervous system of *S. officinalis*. These results suggest a conserved involvement of *otx* in eye maturation and development of the anterior neural structures in *S. officinalis*.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

Most metazoan bilaterian groups present a central condensed nervous system. This kind of organization selected during evolution remains a major point in developmental studies, dealing with the origin of cerebral structures. The study of homeobox genes superfamily has considerably increased the understanding of the nervous system evolution since it has revealed that homologous molecular processes control similar steps of brain development in vertebrates and Ecdysozoa (Holland and Takahashi, 2005).

Among those genes, *otx2/otd* homologs encode transcription factors that play a key role in the brain and eye development. In vertebrates, where three *otx* paralogs are known, *otx2* is involved in the early anterior neural plate specification (Acampora and Simeone, 1999; Simeone, 1998), in the maintenance of the anterior neural pattern (Acampora et al., 2001; Simeone et al., 1993), in the anterior positioning of the fore- and midbrain, delimitating the midbrain–hindbrain boundary, and in the development and terminal differentiation of photoreceptors (Martinez-Morales et al., 2001; Plouhinec et al., 2005). Similarly, in Ecdysozoa, *orthodenticle*

(*otd*) plays a major role in patterning the rostral brain in *Drosophila* (Acampora et al., 2000; Cohen and Jürgens, 1990), and is also involved in the development and terminal differentiation of photoreceptors (Finkelstein et al., 1990; McDonald et al., 2010; Vandendries et al., 1996). In the nematode *Caenorhabditis elegans*, *otx/otd* paralogs are involved in the generation step of the various subcategories of sensory neurons (Satterlee et al., 2001) and in the implementation of the right/left normal asymmetry of the brain (Lanjuin et al., 2003; Nakano et al., 2010).

In Lophotrochozoa, *otx* homologs and their paralogs have been studied in annelids, platyhelminthes and in mollusks. In all these taxa, expression is observed in some anterior nervous structures and eyes. In annelid larva, *otd/otx* orthologs are expressed in the precursors of adult eyes and cerebral ganglia (*Hydroides elegans*, Arenas-Mena and Wong, 2007; *Platynereis dumerilii*, Steinmetz et al., 2011; *Helobdella triserialis*, Bruce and Shankland, 1998). In platyhelminthes (*Dugesia japonica*, Umeson et al., 1999), *otd/otx* orthologs are expressed in the cephalic part of the adult and in photosensitive cells, and in the head during the regeneration processes (*Dugesia tigrina*, Stornaiuolo et al., 1998). In mollusks, *otd/otx* orthologs have only been studied in the gastropod *Patella vulgata*, at the trochophore larvae stage. It is expressed in sensorial

* Corresponding author. Address: MNHN, DMPA, BOME – CNRS UMR 7208, 55 rue Buffon – CP 51, 75005 Paris, France. Tel.: +33 1 40 79 30 97; fax: +33 1 40 79 34 61.
E-mail address: buresi@mnhn.fr (A. Buresi).

head parts: stomodaeum region, prototroche, and in some precursor neural cells (Nederbragt et al., 2002). Until now the expression of *otx* orthologs has been studied in Lophotrochozoa species with an indirect development, showing trochophore larvae with a simple and transient nervous system different than that of the adult one.

Cephalopods (Mollusca) belong to Lophotrochozoa but develop directly: the adult morphology and the adult nervous system are reached at hatching without any metamorphosis (Boletzsky et al., 2006), and no trochophore or veliger larval stage can be observed within the egg. As a consequence, the development of cephalopods provides intriguing issues regarding both its evolution and its mechanisms: the embryonic morphology and orientation are unique among mollusks and the complex brain they possess, even if analogous to that of vertebrates, shows very few bauplan similarities with that of vertebrates. The neural induction in cephalopods first gives rise to a set of distant ganglia, unlike in vertebrates in which the nervous system derives from a unique anlage (Yamamoto et al., 2003). The brain forms from the condensation and fusion of some of the typical mollusk ganglia (cerebroid, pedal and visceral ganglia, Budelmann, 1995), which later differentiate into the highly hierarchized lobes of the brain. The molecular mechanisms at the basis of this organization stay largely unknown and very few data about embryonic polarity are available. Therefore, as a “marker” of anteriority and as a key gene in metazoan brain formation, *otx2* homolog could turn out to be a key gene whose expression study can enlighten the understanding of cephalopod development and of cephalopod brain formation in particular. Here we report for the first time the expression pattern of an *otx2* ortholog in a cephalopod, *Sepia officinalis*, during organogenesis by whole mount *in situ* hybridization. Our results show that *so-otx* is specific to photosensitive structures and brain. *so-otx* is expressed in the retina during all organogeneses, suggesting that it could have conserved an ancestral function in the early setting up and maturation of cephalopod’s eyes. Its expression in the nervous system begins at late developmental stages and is restricted to some ganglia that later constitute the most anterior part of the adult brain. These results reveal that *so-otx* also constitutes a “marker” of anteriority in *S. officinalis* embryos.

1. Results

1.1. *S. officinalis* development

S. officinalis develops directly (i.e. without metamorphosis). The discoidal segmentation of the egg until stage 9 gives rise to a disk-shaped embryo at the animal pole of the egg, which lies on the yolk mass. The gastrulation stretches from stage 10 to 15 and the organogenesis proceeds until stage 30 for 1 month at 20 °C ending in the hatching of the juvenile (Boletzsky et al., 2006). From stage 16 to stage 30, three morphological phases can be described (Fig. 1). During the first period, from stage 15 to 20, the embryo has a disk shape with arms, mouth and eyes primordia located at the periphery, and mantle, gills and funnel primordially located in the center (Fig. 1A and B). At this phase, ganglia emerge in numerous distant regions of the embryo, probably stemming from neurogenic placodes, similar to what is described in the pygmy squid *Idiosepius paradoxus* (Yamamoto et al., 2003) (see colored area in Fig. 1A). In a subsequent phase, from stage 20 to 22, the embryo goes through drastic morphological changes and then acquires the adult orientation (straightening phase of the embryo, Fig. 1C and D). Some ganglia start to contact each other: the cerebroid ganglia develop toward the eyes and form a morphological unit with the future optic ganglia at stage 20, and the visceral ganglia and pedal ganglia get closer (see arrows Fig. 1C). In a third phase, the adult arrangement is reached at stage 22: eye, mouth and arms are located at the yolk side (cephalopodium), and the visceral mass and surrounding mantle (visceropalium) at the opposite side (Fig. 1E–J). This is the last phase of the final brain formation, where ganglia condense and differentiate into lobes. The cerebroid ganglia give rise to the supraesophageal mass (SPM) mostly involved in integrative function, and includes the vertical lobes, the frontal lobes and the basal lobes (Fig. 1G and I). A subesophageal mass (SBM), essentially composed of motor centers is made from two pedal ganglia and two visceral ganglia. The two pedal ganglia form the ASM (anterior subesophageal mass) and the MSM (median subesophageal mass). The two visceral ganglia form the PSM (posterior subesophageal mass) (Fig. 1E and G). The two optic lobes develop on both sides of the brain between the eyes (Fig. 1E and I).

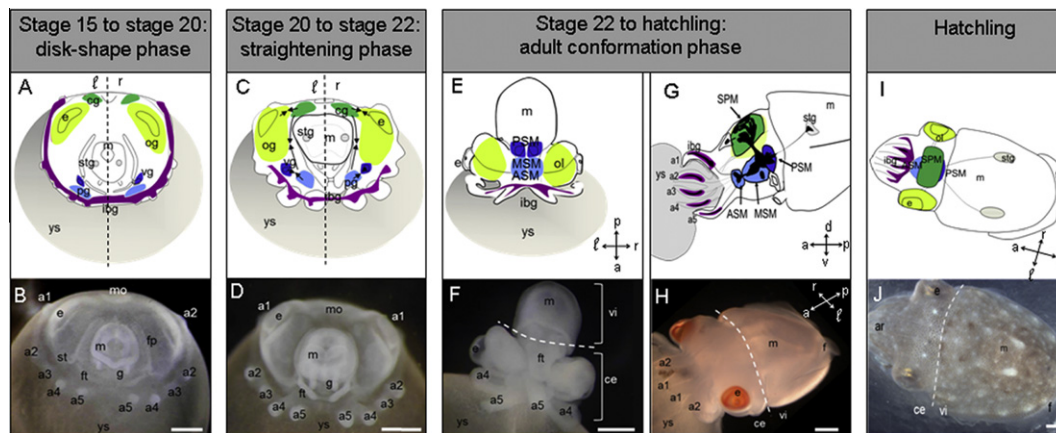


Fig. 1. Up: Embryonic neural territories during *S. officinalis* development, down: corresponding embryos' photographs. *S. officinalis* organogenesis is divided into three phases visually based on the embryo shape. (A and B) Stage 18 representing the disk-shaped phase, apical views. (C and D) Stage 21 representing the straightening phase, apical views. The black arrowheads illustrate the connections of ganglia between them. (E and F) Stage 24 corresponding to the adult conformation phase, ventral views. The cephalopodium and visceropalium are clearly distinguishable (see white dotted line). (G) Longitudinal section showing the nervous interactions between the nervous masses in the brain and with the periphery. (I and J) Embryo at hatching stage, dorsal views. a, anterior; a1–a5, arms; ar, arms; ASM, anterior subesophageal mass; bg, brachial ganglia; ce, cephalopodium; cg, cerebroid ganglia; d, dorsal; e, eye; fp, funnel pouch; ft, funnel tube; g, gill; ibg, interbrachial ganglia; l, left; m, mantle; mo, mouth; MSM, middle subesophageal mass; og, optic ganglia; ol, optic lobe; p, posterior; pg, pedal ganglia; PSM, posterior subesophageal mass; r, right; SPM, supraesophageal mass; st, statocyst; stg, stellate ganglia; v, ventral; vg, visceral ganglia; vi, visceropalium; y, yolk; ys, yolk sack. Scale bars correspond to 1 mm.

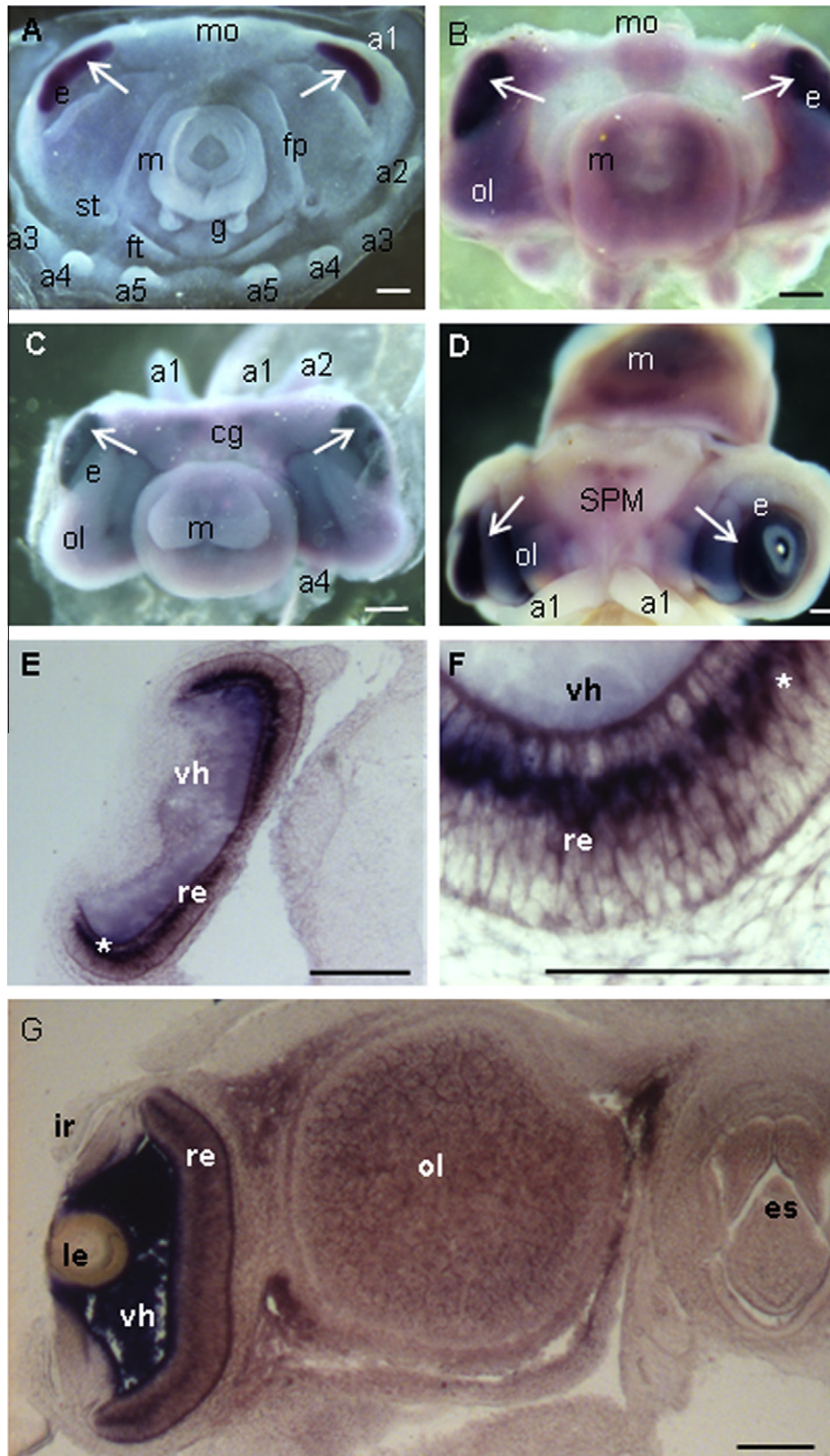


Fig. 2. *so-otx* expression in the eyes and in the retina of *Sepia officinalis* embryos after whole mount *in situ* hybridization with an *otx* antisense probe from stage 19 to stage 26. (A) Stage 19, apical view. *so-otx* is expressed in the optic vesicles (white arrowheads). (B and C) Stage 20 and stage 22, apical views. *so-otx* is expressed in the optic vesicles (white arrowhead) and in the optic lobes. (D) Stage 24, dorsal view. *so-otx* is expressed in the eyes (white arrowheads). (E–G) Transversal sections of eyes. (E) At stage 19, the primary vesicle is just closed. *so-otx* is expressed in the retina in the course of differentiation (asterisk). (F) Focus on the retina at stage 19 showing the expression restricted to the midline. (G) Stage 26, the primary and secondary vesicles are formed. *so-otx* is expressed in the maturing retina and in the optic lobes. a1–a5, arms; e, eye; es, esophagus; cg, cerebroid ganglia; fp, funnel pouch; ft, funnel tube; g, gill; ir, iris; SPM, supraesophageal mass; le, lens; m, mantle; mo, mouth; ol, optic lobe; re, retina; st, statocyst; vh, vitreous humor. Scale bars correspond to 200 μ m.

1.2. *so-otx* expression in the eyes during organogenesis

In all studied stages (from 16 to 26), *so-otx* was expressed in the developing eyes (Fig. 2). At the beginning of the disk shaped phase, an open optic vesicle is formed from an eye placode. After its closing at stage 18, a membrane separates the vesicle into two compartments (Fig. 2A), and the lens differentiates on both sides of the membrane (Mangold, 1989). The retina takes place in the deep compartment, whereas the iris sets up in the upper compartment. At stage 28 a cornea layer forms, totally protecting the iris and the lens. From stage 19, sections show that the expression of *so-otx* is restricted to the retina (Fig. 2E–G), place of photoreception.

1.3. *so-otx* expression in ganglia of the nervous system

The first neural staining is observed at stage 20 (start of the straightening phase of the embryo) in the optic ganglia (Fig. 2B). At stage 21, the cerebroid ganglia start to express *so-otx* (Fig. 3A and G–J). In the same time, an expression in pedal ganglia appears during a short window of development, but unlike optic and cerebroid ganglia, this ends at stage 23 (Fig. 3C–F).

1.4. *so-otx* expression in the maturing brain

From stage 23, the ganglia merge and begin to differentiate into lobes, leading to a supraesophageal mass (SPM) and subesophageal mass (SBM). From stage 23 to hatching, *so-otx* expression is detected in the two optic lobes (Fig. 2D and G) and in the SPM, coming from the cerebroid ganglia. The staining is located in the superior frontal lobe, an unpaired region which constitutes a large band across the front of the SPM (Fig. 4A, B, D, E and G), the subpedunculate lobe (Fig. 4A–E and H) and the median basal lobe (Fig. 4B, E and I). The SBM, which comes from the pedal and visceral ganglia fusion, does not present any *so-otx* expression (Fig. 4B and E).

2. Discussion

In this study we have characterized one *otx/orthodenticle* ortholog in *S. officinalis*, *so-otx*, and we demonstrated that *so-otx* expression is restricted to eyes and some parts of the brain.

2.1. *so-otx* is expressed in the eyes

so-otx is expressed in the eyes of *S. officinalis* embryos at all studied organogenesis stages (Fig. 2), from the developing optic

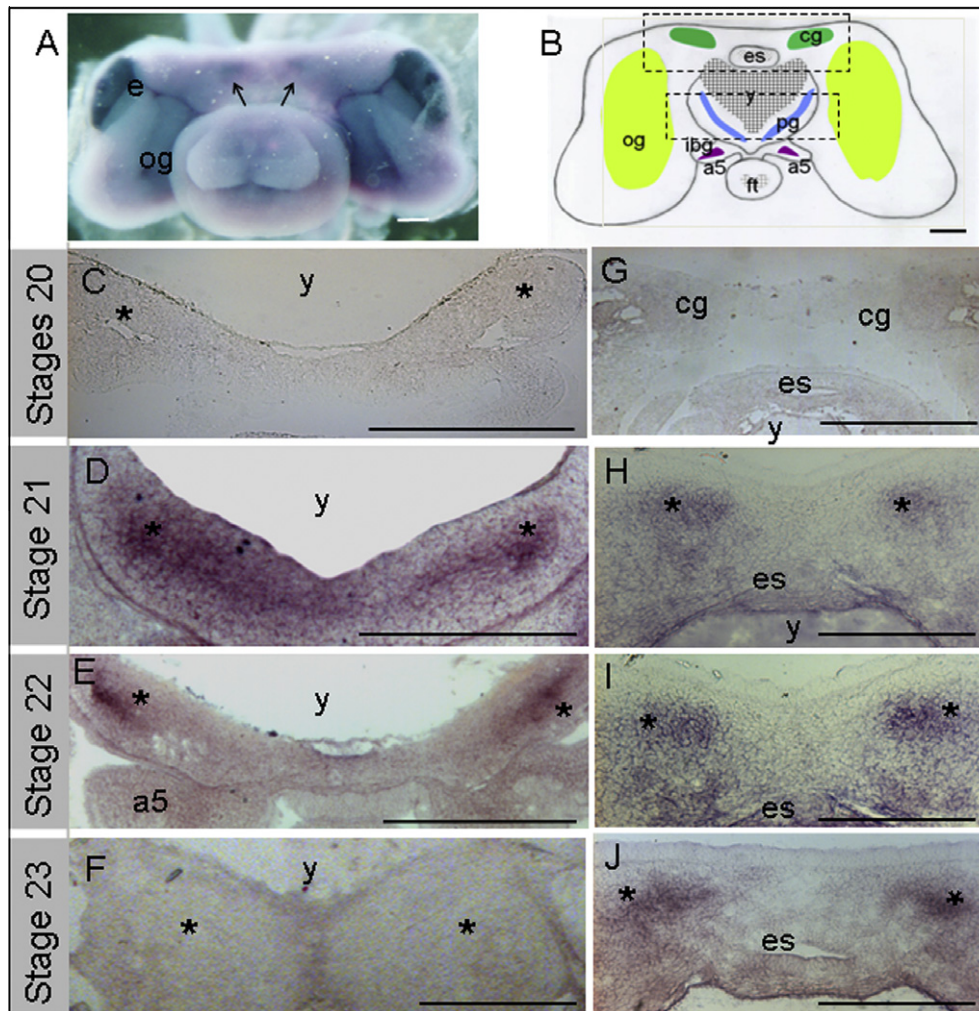


Fig. 3. *S. officinalis* embryos' photographs after *in situ* hybridization with an *otx* antisense probe from stage 20 to stage 23. (A) Stage 22 embryo and (B) schema of frontal section at the level of cerebroid and pedal ganglia. (C–F) Transversal sections through the pedal ganglia from stage 20 to stage 23. *so-otx* expression in the pedal ganglia starts at stage 21 and ends at stage 23 (asterisks). (G–J) Transversal sections through the cerebroid ganglia from stage 20 to stage 23. *so-otx* expression starts at stage 21 and continues to be expressed in stage 23 (asterisks). a5, arm 5; cg, cerebroid ganglia; e, eye; es, esophagus; ft, funnel tube; ibg, interbranchial ganglia; og, optic ganglia; pg, pedal ganglia; y, yolk. Scale bars correspond to 500 μ m.

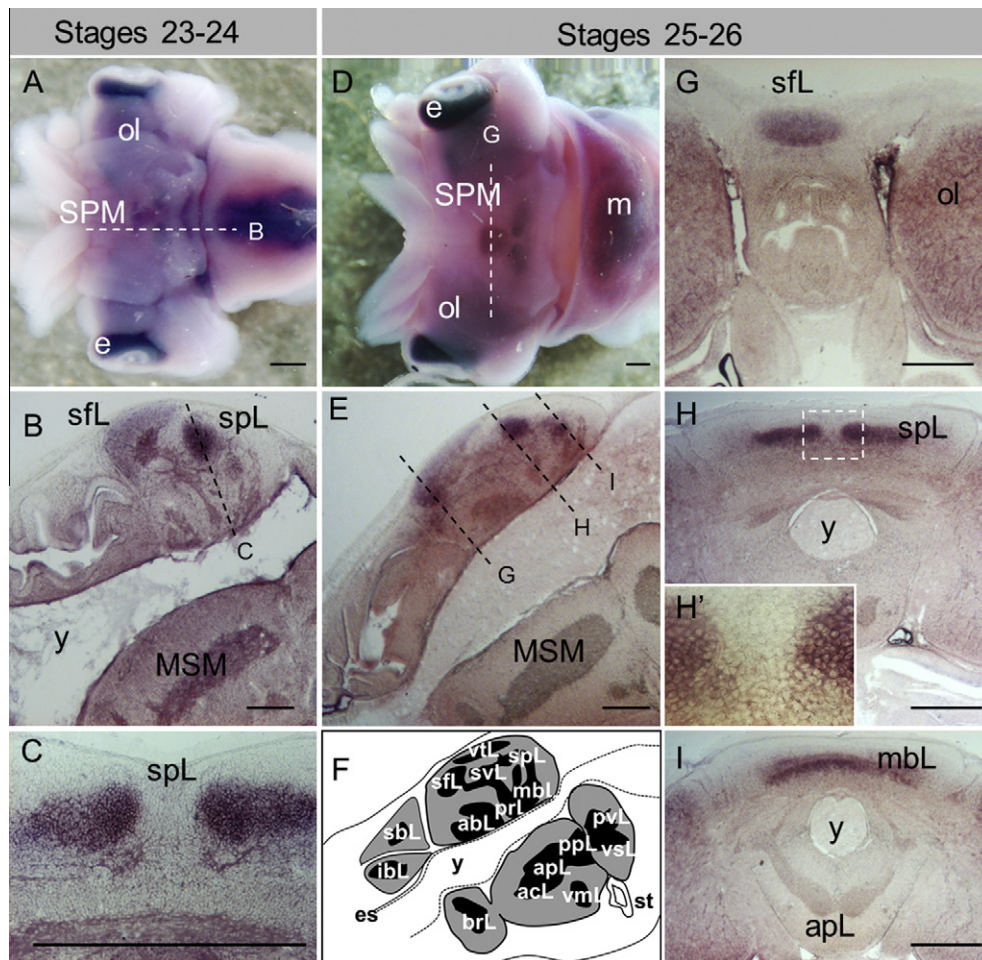


Fig. 4. *S. officinalis* embryos' photographs after *in situ* hybridization with an *otx* antisense probe from stage 23 to stage 26. (A and D) Embryos at stage 24 and stage 26 before longitudinal or transversal sections respectively (white dotted-line, the letters refers to the corresponding figures of sections). The eyes, optic lobes and SPM clearly express *so-otx*. (B and C) Transversal and longitudinal sections of the SPM at stages 23 and 24 respectively. The sfL and spL express *so-otx*. (E) Longitudinal section of the SPM level at stage 25. *so-otx* is expressed in the sfL, spL and mBL. Letters correspond to the figures of transversal sections. (G–I) Transversal sections along the SPM of an embryo at stage 26. The sfL, spL and mBL continue to express *so-otx*. A focus on the spL (see white square in H and H') confirms that staining localized in the cells. (F) Schema of a sagittal section of a 26 stage embryo and lobes disposition within the brain. The annotations take place at the neuropil level, the corresponding lobes extend around. abl, anterior basal lobe; acL, anterior chromatophore lobe; apl, anterior pedal lobe; ASM, anterior sub-esophageal mass; brL, brachial lobe; oe, esophagus; ppl, posterior pedal lobe; prL, precommissural lobe; PSM, posterior sub-esophageal mass; sbL, superior buccal lobe; sfL, superior frontal lobe; spL, sub-pedonculate lobe; SPM, supra-esophageal mass; st, statocyst; svL, subvertical lobe; vsL, visceral lobe; y, yolk. Scale bars correspond to 500 μ m.

vesicle to the functional eye in the retina layer. These results show first evidence that an *otx* ortholog is expressed in the eyes of a mollusk during development, since the sole previous study about *otx* in a mollusk (in *P. vulgata*, Nederbragt et al., 2002), only concerned the eyeless trochophore stage. In other Lophotrochozoa, *otx* expression in photosensitive structures has been observed in the annelid larvae of *H. elegans* and *P. dumerilii* (Arenas-Mena and Wong, 2007; Steinmetz et al., 2011), and in the photoreceptor cells of platyhelminthes (*D. japonica*, Umesono et al., 1999). Consistently among metazoans, the *orthodenticle/otx* genes are known to play a conserved role in the development of all photosensitive structures, whatever the associated photoreceptor type (Nakanishi et al., 2010; Vopalensky and Kozmik, 2009). Interestingly, cephalopod eyes are convergent with those of vertebrates (camerular eye type), which explains why the expression profile observed at the end of the development is very similar to that of *otx2* in the retina of vertebrates (Koike et al., 2007; Nishida et al., 2003; Viczian et al., 2003). Moreover, in vertebrates and *Drosophila*, *otd/otx2* genes are known to directly regulate opsin production, the main constituent of photoreceptors (Ranade et al., 2008; Vopalensky and Kozmik,

2009). As rhodopsin proteins have been characterized in cephalopod eyes (Bellingham et al., 1998; Jardón-Valadez et al., 2010; Paternolli et al., 2009), and considering the expression of *so-otx* in *S. officinalis* eyes, we suggest conservation of the *otx* homologous role in the retinal cell maturation.

2.2. *so-otx* expression in the ganglia of the future anterior brain

In *S. officinalis* ganglia emerge from stage 16 (Baratte and Bonnaud, 2009) and present an early functional specification, in particular by the differential expression of some neuropeptides and neurotransmitters (Aroua et al., 2011). Noteworthy, *so-otx* in nervous areas is expressed only from stage 20 (cerebroid and pedal ganglia Fig. 3). This suggests that the *otx* ortholog in *S. officinalis* would not intervene in the early specification and emergence of neural tissues, unlike other species such as *Drosophila*, in which *otx* orthologs have a role in early neural determination even before the gastrulation step (Cohen and Jürgens, 1990; Hirth et al., 1995). However, it would be necessary to explore expressions at earlier stages, before organogenesis begins, during the nervous placodes emergence.

otx expression is observed from stage 20 in the optic ganglia, and from stages 21 to 23, the expression extends to cerebroid and pedal ganglia (Fig. 3). This phase corresponds to a major step in the organization of the nervous system, during which some ganglia gather in a central position (cerebroid, pedal and visceral ganglia) and connect to each other to form the brain (Fig. 1). Our results show that *so-otx* is expressed only in ganglionic structures that will constitute the future brain of the adult: no *so-otx* expression is observed in ganglia that will stay peripheral (stellar, buccal and inter-brachial ganglia). Interestingly, *so-otx* is not expressed in all the ganglia of the future brain: only the most anterior ganglia are concerned (optic, cerebroid and pedal ganglia), while the visceral ganglia, which establish the posterior subesophageal mass of the adult brain, do not express *so-otx*. These observations strongly support the role of *otx/otd* homologs as a “marker” of anteriority that has already been observed in the most anterior components of the presumptive brain of numerous species: in some precursor neural cells in the trochophore larvae of *P. vulgata* (Nederbragt et al., 2002), in the cerebral ganglia of the *H. elegans* larvae (Arenas-Mena and Wong, 2007), in the brain of the *D. japonica* larvae (Cebrià et al., 2002), in the central ganglia of *H. triserialis* (Bruce and Shankland, 1998), in the anterior neuromere of the embryo of *Drosophila* (Hirth et al., 1995), and in the forebrain and midbrain of mouse embryo, the hindbrain being not concerned (Boyl et al., 2001).

2.3. *so-otx* expression during brain maturation

From stage 24, brain organization is achieved: the ganglia are fused into lobes that mature and in which cell types differentiate. From this stage, *so-otx* expression became specific to the supraesophageal mass (SPM) deriving from the cerebroid ganglia. By contrast, the supraesophageal mass (SBM) deriving from the pedal and visceral ganglia showed no *so-otx* expression, demonstrating a regulation of *otx* expression in the maturing brain (Fig. 4).

Numerous other species present a local *otx* homologs expression during the late phase of brain maturation, during which the gene is known to play a role in the neural functional differentiation. In *D. japonica* (platyhelminth) and in *C. elegans* (nematode), the *Otd*-like proteins are involved in the specification of neuronal subtypes allowing photosensitive, thermosensitive and chemosensory perceptions (Lanjuin et al., 2003; Satterlee et al., 2001; Svendsen and McGhee, 1995; Umesono et al., 1999). In *S. officinalis*, *so-otx* distribution may also be connected to similar maturation processes. Actually, the lobes of the SPM where *so-otx* is expressed essentially present sensory functions. The frontal lobe is involved in learning and memory processes in the adult (Boycott, 1960; Nixon and Young, 2003), in tactile as well as visual learning (Wells and Wells, 1957; Young, 1971). The median basal lobe receives optic, olfactory, static and tactile afferents; it is a component of the higher motor center highly associated with sensorial inputs (Nixon and Young, 2003). *so-otx* is also expressed in the subpedonculate lobe, in the region from which efferent peripheral nerve fibers arise (Young, 1971). Besides this sensory implication, *otx2* homologs are also known to be involved in the maturation of some dopaminergic neurons in vertebrates (Di Salvio et al., 2010; Simeone et al., 2011) and *Drosophila* (Blanco et al., 2011). As dopaminergic neurons distribute in adult cephalopod in almost all of the brain (Messenger, 1996), the possibility remains that *so-otx* could be involved in the differential maturation of these neurons in the *S. officinalis* brain.

2.4. Conclusion

As we expected, our results show that *so-otx* stays definitively specific to the anterior part of the animal that is in the presumptive

and achieved head region, more precisely in the photosensitive structures and brain. *so-otx* is expressed during the early set up and maturation of the eye, giving evidence that *otx* genes are also expressed in mollusk eyes. These data strengthen the known involvement of *otd/otx* ortholog in photoreception evolution. During the organogenesis, *so-otx* is expressed in the ganglia that later constitute the most anterior part of the brain, suggesting that it could be involved in the anterior brain regionalization in cephalopods. This point is all the more interesting that the nervous territories in cephalopods do not emerge from a unique tissue (as in vertebrates or insects), but from distant ganglionic regions.

Further studies should be conducted to investigate how the neural induction takes place in cephalopods.

3. Experimental procedures

3.1. Collecting of *S. officinalis* embryos

From May to September, fertilized eggs were retrieved from the biological stations of Luc-sur-Mer (France), Concarneau (France), and Roscoff (France). Eggs were kept in artificial sea water with aeration at controlled temperature (17–19 °C). In these conditions, embryos generally took 30 days to directly develop until hatching. Each day, individual eggs were taken from the aquarium and embryos were extracted from the numerous surrounding envelopes and chorion, a tough membrane that surrounds the eggs, using thin clips in filtered sea water. Then embryos were staged using the Lemaire's system for *S. officinalis* (Lemaire, 1970), and anesthetized in cold chamber (4 °C) or on ice. Embryos at stage 15 to 30 were selected and fixed in 3.7% paraformaldehyde (PFA) in filtered and buffered sea water at room temperature, for 2 or 3 h (depending on the stage). After four rinses in phosphate buffered saline (PBS) at room temperature, embryos were placed in 30% glycerol/PBS for 2 h at room temperature, and transferred to 50% glycerol overnight at 4 °C. They were conserved at –20 °C until use.

3.2. Cloning of *otx*

Partial sequence of *otx* was obtained from ESTs library (Genoscope CEA project) built from *S. officinalis* embryos cDNA (protocol described in Bassaglia et al., 2012). Automatic annotations have allowed among 50,000 randomly chosen clones sequenced to find one-annotated singlet only corresponding to *otx*. This search was confirmed by blasting relevant known sequences against EST, tc and singlet databases through SAMS blast interface. Primers were designed from this sequence, covering the homeodomain (Fig. 5, blue box): *otx*-F1 (5'-AACGAACGGATGACTTCAGG-3', RTDDFR) and *otx*-R3 (5'-CAGCTATTAGGGCCATCAA-3', LMGPNS). They were used to amplify a 470 bp fragment in *S. officinalis*. The RNAs of *S. officinalis* were extracted from a pool of embryos from stage 15 to 23 using Tri Reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA). mRNAs were isolated thanks to the gDNA Eliminator column then converted into cDNA by the omniscrypt reverse-transcriptase (Qiagen, PCR conditions were: 92 °C for 5 min + (92 °C for 1 min, 58 °C for 1 min, 72 °C for 1 min) for 40 cycles + 72 °C for 4 min. PCR products were cloned into TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and sequenced by GATC Biotech (Konstanz, Germany), then analyzed with GenBank BLASTn and BLASTx (BLAST, basic local alignment search tool). The analysis of the sequencing confirmed the identity of the fragments (Fig. 5). The homeodomain presents a 96% identity with that of the *Octopus bimaculoides*. Furthermore, the identities of *So-otx* homeodomain with other *Otd/Otx2* orthologs are at least 89%, and are between 73% and 87% with *Otx1* and *Crx* (another *Otx* protein present in vertebrates, Plouhinec et al., 2003) orthologs, showing that *so-otx* is an *otx2* ortholog.



Fig. 5. Amino acid sequence of the *otd/otx* ortholog found in the EST bank of *Sepia officinalis* (*so-otx*) compared with some other related *otd/otx* sequences. The homeodomains are in red box and the primers used for PCR are in blue box. Three *Otp* homeodomains (orange box), homologous to the *Otd/Otx* homeodomain proteins, have been added to bring further evidence that *so-otx* is an *otd/otx* ortholog. *Lophotrochozoa*: Ob: *Octopus bimaculoides* (Cephalopod, AAZ99218); Pdu: *Platineris dumerili* (annelid, Q9GNU9); Pv: *Patella vulgata* (gastropod, Otp: Q8MWG2; Otx: Q8MWG3). *Ecdysozoa*: Dme: *Drosophila melanogaster* (fruit fly, Otd: P22810; Otp: Q9W2Q4); Tc: *Tribolium castaneum* (insect, O46170). *Deuterostomes*: Hu: Human (P32243); Mmu: *Mus musculus* (mouse, Crx: O54751; Otp: O09113; Otx1: AAL24809; Otx2: P80206); Xl: *Xenopus laevis* (frog, Q91813). Cnidaria: Aur: *Aurelia sp.* (ADB66163).

3.3. Probes synthesis and in situ hybridization

RNA probes of 535 pb were obtained with the Dig RNA labeling mix kit from ROCHE. Antisense probe was obtained with T3 polymerase (ROCHE), from a direct insertion type of the PCR product in the vector, and the sense probe for control was obtained with T7 polymerase (ROCHE). For the ISH, at least three embryos from each studied stage were treated and controls were done for each stage. The glycerol was removed by successive immersions in PTW (PBS 1X, Tween20 0.10%). Embryos were treated by proteinase K in PTW (10 µg/ml, 20 to 45 min, depending on the stage of the embryos). They were post fixed for 1 h in 3.7% PFA in PTW. A prehybridization step was done in SH solution (Formamide 50%, standard saline citrate 5X, sodium dodecyl sulfate 0.5%, Tween20 1%) added of heparin and tRNA (33 µg/ml and 400 µg/ml), during 6 h at 65 °C. Embryos were incubated for one night at 65 °C in SH solution with probes (heparin 25 µg/ml, tRNA 100 µg/ml). Excess on the probes was eliminated by four rinses (30 min, 65 °C) in SH solution and by progressive impregnation in standard saline citrate 2X. Embryos were impregnated in MABT (Maleic acid 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5, Tween20 1%). Saturation was done in blocking solution (MABT, BB 4% Roche, fetal bovine serum FBS 15%, 1 h, RT), followed by incubation for 1 night at 4 °C with anti-digoxigenin antibodies (Roche) coupled to alkaline phosphatase (AP) in blocking solution (MABT, BB 2.4%, FBS 20%). Revelation of AP activity was done using NBT-BCIP (Roche), and the reaction was stopped by washing in PTW solution. Embryos were fixed in 3.7% PFA in PBS (24 h). To visualize internal expressions, embryos were included in 15% sucrose, 7.5% gelatin in a phosphate buffer solution 0.12 M before being frozen in isopentane at –80 °C, and finally cut into 20 µm cryostat sections. Observations were done with a Leica M16 2F binocular stereomicroscope and Leica microscope.

Acknowledgements

We are grateful to Aude Andouche for technical assistance. We would like to 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 Leanne Hardman and Christian Atkinson (Erasmus programme, Univ. Keele/MNHN) for helpful corrections on the article.

References

Acampora, D., Simeone, A., 1999. Understanding the roles of Otx1 and Otx2 in controlling brain morphogenesis. *TINS* 22, 116–122.
 Acampora, D., Gulisano, M., Simeone, A., 2000. Genetic and molecular roles of Otx homeodomain proteins in head development. *Gene* 246, 23–35.
 Acampora, D., Gulisano, M., Broccoli, V., Simeone, A., 2001. Otx genes in brain morphogenesis. *Prog. Neurobiol.* 64, 69–95.
 Arenas-Mena, C., Wong, K.S., 2007. HeOtx expression in an indirectly developing polychaete correlates with gastrulation by invagination. *Dev. Genes Evol.* 217, 373–384.
 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 (Jena)* 114, 113–122.
 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.
 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* 2012, in press.
 Bellingham, J., Morris, A.G., Hunt, D.M., 1998. The rhodopsin gene of the cuttlefish *Sepia officinalis*: sequence and spectral tuning. *J. Exp. Biol.* 211, 2299–2306.
 Blanco, J., Pandey, R., Wasser, M., Udolph, G., 2011. Orthodenticle is necessary for survival of a cluster of clonally related dopaminergic neurons in the *Drosophila* larval and adult brain. *Neural Dev.* 6, 34.
 Boletzky, S., Erlwein, B., Hofmann, D.K., 2006. The *Sepia* egg: a showcase of cephalopod embryology. *Life Environ.* 56, 191–201.
 Boycott, B.B., 1960. The functional organization of the brain of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Proc. R. Soc. London* 153, 503–534.

- Boyl, P.P., Signore, M., Annino, A., Barbera, J.P., Acampora, D., Simeone, A., 2001. Otx genes in the development and evolution of the vertebrate brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19, 353–363 (Review).
- Bruce, A.E., Shankland, M., 1998. Expression of the head gene *Lox22-Otx* in the leech *Helobdella* and the origin of the bilaterian body plan. *Dev. Biol.* 201, 101–112.
- 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, Basel, pp. 115–138.
- Cebrià, F., Kudome, T., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T., Agata, K., 2002. The expression of neural-specific genes reveals the structural and molecular complexity of the planarian central nervous system. *Mech. Dev.* 116, 199–204.
- Cohen, S.M., Jürgens, G., 1990. Mediation of *Drosophila* head development of gap-like segmentation genes. *Nature* 346, 482–488.
- Di Salvio, M., Di Giovannantonio, L.G., Omodei, D., Acampora, D., Simeone, A., 2010. Otx2 expression is restricted to dopaminergic neurons of the ventral tegmental area in the adult brain. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 939–945.
- Finkelstein, R., Smouse, D., Capaci, T.M., Spradling, A.C., Perrimon, N., 1990. The orthodenticle gene encodes a novel homeo domain protein involved in the development of the *Drosophila* nervous system and ocellar visual structures. *Genes Dev.* 4, 1516–1527.
- Hirth, F., Therianos, S., Loop, T., Gehring, W.J., Reichert, H., Furukubo-Tokunaga, K., 1995. Developmental defects in brain segmentation caused by mutations of the homeobox genes orthodenticle and empty spiracles in *Drosophila*. *Neuron* 15, 769–778.
- Holland, P.W., Takahashi, T., 2005. The evolution of homeobox genes: implications for the study of brain development. *Brain Res. Bull.* 66, 484–490 (Review).
- Jardón-Valadez, E., Bondar, A.N., Tobias, D.J., 2010. Coupling of retinal, protein, and water dynamics in squid rhodopsin. *Biophys. J.* 99, 2200–2207.
- Koike, C., Nishida, A., Ueno, S., Saito, H., Sanuki, R., Sato, S., Furukawa, A., Aizawa, S., Matsuo, I., Suzuki, N., Kondo, M., Furukawa, T., 2007. Functional roles of Otx2 transcription factor in postnatal mouse retinal development. *Mol. Cell. Biol.* 27, 8318–8329.
- Lanjuin, A., VanHoven, M.K., Bargmann, C.I., Thompson, J.K., Sengupta, P., 2003. Otx/otd homeobox genes specify distinct sensory neuron identities in *C. elegans*. *Dev. Cell* 5, 621–633.
- Lemaire, J., 1970. Table de développement embryonnaire de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). *Bull. Soc. Zool. France* 95, 773–782.
- Mangold, K., 1989. Les yeux, organes de la vision, In: Grassé, P.P. (Ed.), *Traité de zoologie/Céphalopodes*, Tome V Fascicule 4. Masson, Paris, pp. 275–294.
- Martinez-Morales, J.R., Signore, M., Acampora, D., Simeone, A., Bovolenta, P., 2001. Otx genes are required for tissue specification in the developing eye. *Development* 128, 2019–2030.
- McDonald, E.C., Xie, B., Workman, M., Charlton-Perkins, M., Terrell, D.A., Reischl, J., Wimmer, E.A., Gebelein, B.A., Cook, T.A., 2010. Separable transcriptional regulatory domains within Otd control photoreceptor terminal differentiation events. *Dev. Biol.* 347, 122–132.
- Messenger, J.B., 1996. Neurotransmitters of cephalopods. *Invert. Neurosci.* 2, 95–114.
- Nakanishi, N., Yuan, D., Hartenstein, V., Jacobs, D.K., 2010. Evolutionary origin of rhopalia: insights from cellular-level analyses of Otx and POU expression patterns in the developing rhopalian nervous system. *Evol. Dev.* 12, 404–415.
- Nakano, S., Ellis, R.E., Horvitz, H.R., 2010. Otx-dependent expression of proneural bHLH genes establishes a neuronal bilateral asymmetry in *C. elegans*. *Development* 137, 4017–4027.
- Nederbragt, A.J., Te Welscher, P., Van den Driesche, S., Van Loon, A.E., Dictus, W.J., 2002. Novel and conserved roles for orthodenticle/otx and orthopedia/otp orthologs in the gastropod mollusc *Patella vulgata*. *Dev. Genes Evol.* 212, 330–337.
- Nishida, A., Furukawa, A., Koike, C., Tano, Y., Aizawa, S., Matsuo, I., Furukawa, T., 2003. Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat. Neurosci.* 6, 1255–1263.
- Nixon, M., Young, J.Z., 2003. *The Brains and Lives of Cephalopods*. Oxford University Press, Oxford.
- Paternolli, C., Neebe, M., Stura, E., Barbieri, F., Ghisellini, P., Hampp, N., Nicolini, C., 2009. Photoreversibility and photostability in films of octopus rhodopsin isolated from octopus photoreceptor membranes. *J. Biomed. Mater. Res. A* 88, 947–951.
- Plouhinec, J.L., Sauka-Spengler, T., Germot, A., Le Mentec, C., Cabana, T., Harrison, G., Pieau, C., Sire, J.Y., Véron, G., Mazan, S., 2003. The mammalian Crx genes are highly divergent representatives of the Otx5 gene family, a gnathostome orthology class of orthodenticle-related homeogenes involved in the differentiation of retinal photoreceptors and circadian entrainment. *Mol. Biol. Evol.* 20, 513–521.
- Plouhinec, J.L., Leconte, L., Sauka-Spengler, T., Bovolenta, P., Mazan, S., Saule, S., 2005. Comparative analysis of gnathostome Otx gene expression patterns in the developing eye: implications for the functional evolution of the multigene family. *Dev. Biol.* 278, 560–575.
- Ranade, S.S., Yang-Zhou, D., Kong, S.W., McDonald, E.C., Cook, T.A., Pignoni, F., 2008. Analysis of the Otd-dependent transcriptome supports the evolutionary conservation of CRX/OTX/OTD functions in flies and vertebrates. *Dev. Biol.* 315, 521–534.
- Satterlee, J.S., Sasakura, H., Kuhara, A., Berkeley, M., Mori, I., Sengupta, P., 2001. Specification of thermosensory neuron fate in *C. elegans* requires ttx-1, a homolog of otd/Otx. *Neuron* 31, 943–956.
- Simeone, A., Acampora, D., Mallamaci, A., Stornaiuolo, A., D'Apice, M.R., Nigro, V., Boncinelli, E., 1993. A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J.* 12, 2735–2747.
- Simeone, A., 1998. *Otx1* and *Otx2* in the development and evolution of the mammalian brain. *EMBO J.* 17, 6970–6978.
- Simeone, A., Di Salvio, M., Di Giovannantonio, L.G., Acampora, D., Omodei, D., Tomasetti, C., 2011. The role of otx2 in adult mesencephalic-diencephalic dopaminergic neurons. *Mol. Neurobiol.* 43, 107–113.
- Steinmetz, P.R., Kostyuchenko, R.P., Fischer, A., Arendt, D., 2011. The segmental pattern of otx, gbx, and Hox genes in the annelid *Platynereis dumerilii*. *Evol. Dev.* 13, 72–79.
- Stornaiuolo, A., Bayascas, J.R., Salò, E., Boncinelli, E., 1998. A homeobox gene of the orthodenticle family is involved in antero-posterior patterning of regenerating planarians. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 1153–1158.
- Svendsen, P.C., McGhee, J.D., 1995. The *C. elegans* neuronally expressed homeobox gene *ceh-10* is closely related to genes expressed in the vertebrate eye. *Development* 121, 1253–1262.
- Umesono, Y., Watanabe, K., Agata, K., 1999. Distinct structural domains in the planarian brain defined by the expression of evolutionarily conserved homeobox genes. *Dev. Genes Evol.* 209, 31–39.
- Vandendries, E.R., Johnson, D., Reinke, R., 1996. Orthodenticle is required for photoreceptor cell development in the *Drosophila* eye. *Dev. Biol.* 173, 243–255.
- Viczian, A.S., Vignali, R., Zuber, M.E., Barsacchi, G., Harris, W.A., 2003. XOTx5b and XOTx2 regulate photoreceptor and bipolar fates in the *Xenopus* retina. *Development* 130, 1281–1294.
- Vopalensky, P., Kozmik, Z., 2009. Eye evolution: common use and independent recruitment of genetic components. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 364, 2819–2832 (Review).
- Wells, M.J., Wells, J., 1957. The function of the brain of *Octopus* in tactile discrimination. *J. Exp. Biol.* 34, 131–142.
- 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., 1971. *The Anatomy of the Nervous System of Octopus vulgaris*. Clarendon Press, Oxford.

ARTICLE 3

Buresi, A., Croll, R., Bonnaud, L., Baratte, S. Dynamic of tactile and chemical sensory structures emergence during skin development in *Sepia officinalis*. (in prep).

Dynamic of tactile and chemical sensory structures emergence during skin development in *Sepia officinalis*

Buresi^{1,2}, A., Croll³, R.P., Bonnaud^{1,4}, L. and Baratte^{1,5}, S.

¹ Museum National d'Histoire Naturelle (MNHN), DMPA, UMR Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), MNHN CNRS 7208, IRD 207, UPMC, 55 rue Buffon, CP51 75005 Paris, France

² Université Paris Pierre et Marie Curie - Paris 6, Paris, France

³ Department of Physiology and Biophysics, Dalhousie, Halifax, Nova Scotia, Canada B3H 4R2

⁴ Université Paris Diderot - Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁵ Université Paris Sorbonne - Paris 4, Paris France

Author for correspondence: Sébastien Baratte (e-mail: baratte@mnhn.fr)

ABSTRACT

The development of the skin sensory cells has been investigated and described during the embryogenesis of a cephalopod, *Sepia officinalis*. As revealed by the expression of *Sof-elav1* gene, one of the first marker of neural differentiation, both olfactory organs appear in very early stages of organogenesis, when most ganglia also start to be delineated. Far later in organogenesis (when the embryo has reached its definitive juvenile morphology), the other future juvenile sensory structures differentiate. These are the eight mechanoreceptive lateral lines running on the head surface and on arms and the numerous sensory cells covering the entire outer skin surface (including the sucker sensory cells). We also show that the juvenile skin, in which these sensory structures differentiate, is issued from discrete epidermal territories of the early embryo. The *Pax37* orthologous gene of *S. officinalis*, involved in epidermis specification in vertebrates, appears to be specifically expressed in these territories and the temporal study of its expression shows how these territories develop and ultimately become the definitive skin of the head region. These descriptive and genetic data provide new insights into the nervous development in a cephalopod embryo. The early differentiation of olfactory structures and the peculiar development of the adult skin we show here provide interesting parallels with other molluscs species undergoing indirect development (i.e. with larval and metamorphosis stages).

Key words: sensory cells, Elav, Pax37, epidermis development

INTRODUCTION

Comparisons of body plans and organs (actual and fossil), developmental processes, and gene functions and sequences provide the foundation for understanding how evolution has designed past and present biodiversity. For some phyla, however, evolutionary events have been so numerous and so drastic that comparisons with other taxa turn out to be difficult or confusing. Cephalopods, for instance, belong to Molluscs but the numerous evolutionary novelties which made them efficient marine predators have both led to drastic divergences with the typical mollusc body plan and to puzzling convergences with vertebrates (Shigeno et al. 2010). In all cephalopod species except Nautilus, the external protective shell, typical of most Molluscs, has been internalized and the mantle has become a powerful locomotory organ. The ancestral molluscan foot is hypothesized to have evolved into a funnel for jet propulsion and into prehensile arms (Boletzky 1988; Shigeno et al. 2008). The ganglionic nervous system has reached an incomparable degree of centralization and the sensory organs, like eyes and 'lateral lines' show striking convergences with those of vertebrates. As a final, but not least, divergence from other molluscs, cephalopods have lost their larval phase of development. Most mollusc species hatch as free-

living and autonomous larvae (at the trochophore or veliger stage) that will later metamorphose into a juvenile form. Even in pulmonate species, where hatching gives birth to adult-like juveniles, larval stages can be recognized as encapsulated in the egg where they undergo metamorphosis. In the eggs of cephalopods, however, embryos possess a large amount of yolk and directly develop into adult-like juveniles without passing through any recognizable larval-like morphology and without any metamorphosis event (Boletzky 1988).

The evolution of a "true" direct development in cephalopods is thus unique among molluscs and provides a challenging evolutionary issue, as it is often difficult to homologize structures between cephalopod embryos and the embryos or larvae of other molluscs. Modern applications of molecular biology and other specific staining techniques appear, however, to be on the brink of finally overcoming this hurdle. In particular, comparisons of the development of nervous systems within molluscs can be an interesting starting point. A body of studies now clearly establishes that many other Molluscs possess larval nervous systems that predate the adult nervous system and are far more extensive than previously thought, (Croll and Voronezhskaya 1996; Voronezhskaya et al. 1998; Dickinson et al. 1999; Voronezhskaya et al. 2002;

Wanninger and Haszprunar 2003). These larval nervous systems often consist of an apical sensory organ (ASO), posterior FMRFamide immunoreactive neurons and catecholamine-containing peripheral neurons (Croll and Dickinson 2004, Croll 2006) and include early sensory neurons that may mediate the detection of external chemical cues inducing metamorphosis (Pechenik et al. 2007). In cephalopod embryos, it is generally assumed that the ancestral “larval nervous system and its sensory components” have been lost in the course of the evolution towards direct development: no larval nervous system has previously been described in cephalopods, but instead, the typical ganglia of molluscs directly develop into the juvenile nervous system, either becoming peripheral ganglia (brachial, gastric, cardiac and stellate) or fusing into brain lobes (cerebral, palliovisceral, pedal) (Shigeno et al. 2001; Marquis 1989; Yamamoto et al. 2003). Recently, however, a few studies indicate that some ganglia and neurons differentiate in very early stages of *S. officinalis* organogenesis. As they are forming, most ganglia contain large numbers of catecholaminergic terminals which appear to originate from peripheral sensory neurons (Baratte and Bonnaud 2009) and both palliovisceral ganglia, in particular, show massive numbers of differentiating neurons long before any other ganglia and long before hatching (Wollesen et al. 2010; Aroua et al. 2011; Buresi et al. 2013). These data suggest that the cephalopod embryos develop an early nervous system and even possess early sensory capacities, which would suggest that cephalopods are maybe not so divergent from other molluscs as often assumed and may still possess some “larval” features during their organogenesis.

Recent studies have revealed that *Sepia officinalis* embryos are able to react to tactile, chemical or visual stimuli (Darmaillacq et al. 2008; Romagny et al. 2012). Chemical and tactile stimuli even seem to be detected quite early during embryogenesis (Romagny et al. 2012). In order to correlate these early capacities with the early development of sensory structures, we examined the development of the juvenile skin in *S. officinalis* and the emergence of potential tactile and chemical sensory structures in it. We specifically searched for early expression of *Sof-elav1* in the embryo ectoderm, as this gene is one of the first markers of differentiating neurons in metazoans (Campos et al. 1987; Sakakibara et al. 1996; Denes et al., 2007; Marlow et al., 2008) and in *S. officinalis* (Buresi et al. 2013). In addition, the *S. officinalis* homologue of *Pax3* (*Sof-Pax37*) has also been identified as a potential marker of adult epidermis specification. In vertebrates, *Pax3* is a transcription factor that plays a role in embryonic development of several ectodermic cell types, including progenitor cells of melanocytes and cells of the neural crest fated to become peripheral neurons (see Le Douarin and Kalcheim 1999). We focused our attention on the embryonic development of the future tactile and chemical structures of *S. officinalis* juveniles (see Budelmann 1996): the numerous

isolated sensory neurons all over the skin (Graziadei 1964; Sundermann-Meister 1978; Boletzky 1989; Fioroni 1990; Mackie 2008; Baratte and Bonnaud 2009), the olfactory organs, which correspond to two pits on the cheek-hills and the eight lateral lines, which are epidermal lines of ciliated cells along the head and arms (Sundermann 1983), analogous to the mechanoreceptive lateral lines of fish and aquatic amphibians and able to sense local water movements (Budelmann and Bleckmann 1988; Komak et al. 2005). The results obtained by *Sof-Pax37 in situ* hybridizations reveal that only some specific and discrete areas of the early embryonic ectoderm (essentially from the arm, the funnel and the mantle) become the final outer skin of the juvenile. The *Sof-Pax37* positive areas of the ectoderm ultimately cover the entire embryo surface and develop most of the tactile and chemical nervous structures from stage 24, as revealed by *Sof-elav1* hybridizations (isolated sensory cells and lateral lines). One noticeable exception is the early emergence of the olfactory organs at stage 16, at the very first stages of organogenesis, in a non-*Sof-Pax37* territory of the head region. The final head epidermis, expanding from the arms, covers all the head (even the eyes to form the eye lids) except both olfactory organs, which creates two epidermal pits above.

MATERIAL AND METHODS

Animal care and staging of embryos

Embryos used in this study were gathered from fertilized egg batches which were collected from the marine station of Luc-sur-mer (France) between April and September. Eggs were kept at 20°C in oxygenated sea water, and samples were opened daily to obtain a complete collection of the morphological steps of organogenesis for *Sepia officinalis* (according to Lemaire, 1970). Under these conditions, embryos generally took 30 days to grow and developed directly into juveniles inside a chorion surrounded by numerous dark membranes. These layers were removed in sea water and embryos were fixed in 3.7% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7.4) at room temperature for 1h for immunostaining and overnight for *in situ* hybridizations. After stage determination using a stereo dissecting microscope, embryos were washed for 5 min. in PBS (3 times), dehydrated in baths of increasing glycerol concentration and then stored at -20°C in 30% glycerol in PBS. All animal procedures were in compliance with the guidelines of the European Union (directive 86/609) and the French law (decree 87/848) regulating animal experimentation. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

Sof-Pax37 cloning and probe synthesis

Total RNA of *Sepia officinalis* was extracted from a pool of embryos from stage 15 to 23 using Tri

Reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA). mRNAs were isolated with the gDNA Eliminator column then converted into cDNA by the omniscrypt reverse-transcriptase (Qiagen). *Sof-Pax37* has been characterized in an EST library that was previously generated (Bassaglia et al., 2012) and initial amplification primers for polymerase chain reaction were synthesized: Forward: 5'-GTCTCACGGATGCGTCAGTA-3' and Reverse: 5'-TTCCGAGTCAGCGTCTGAGAT-3'. PCR conditions were: 95°C for 5 min + (95°C for 30 s. min, 58°C for 30 s., 72°C for 1 min) for 35 cycles + 72°C for 10 min. These procedures resulted in the amplification of a 427 bp fragment. The PCR product was cloned into TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), sequenced by GATC Biotech (Konstanz, Germany), and then analyzed with GenBank BLASTn and BLASTx (BLAST, basic local alignment search tool). The analysis of the sequencing confirmed the identity of the fragments. RNA probes were obtained with the digoxigenin (DIG) RNA labeling mix kit from Roche (Mannheim, Germany). According to the sense of PCR product insertion into the vector, the antisense probe was obtained with T3 polymerase (Roche) and the sense probe for control was obtained with T7 polymerase (Roche).

In situ hybridization and immunostaining

In situ hybridizations using the *Sof-Pax37* probe described above or the *Sof-elav1* probe described by Buresi et al. (2012) were performed, using at least 3 embryos at each of stages 17 to 30 (hatchlings), as also described by Buresi et al. (2012). Specimens used for negative controls (DIG-labelled sense probe and anti-digoxigenin antibody conjugated to alkaline phosphatase) did not show any staining. Labelling of neurites was performed using antibodies against raised alpha-tubulin (DM1A antibody, for confocal analyses) or against acetylated alpha-tubulin (6-11B1, Sigma, Saint-Louis, MO, USA, for sectioned tissues as described in Baratte and Bonnaud 2009). Specimens processed without incubation in the primary antibody (negative controls) did not show any staining. Observations were done with a Leica M16 2F binocular stereomicroscope and Leica microscope. For further examination of the developing sensory cells, specimens were imaged with a Zeiss LSM 510 META laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss, Thornwood, NY).

RESULTS

Sof-Pax37 expression during development of the juvenile skin

In early stages of organogenesis, *Sof-Pax37* is first expressed in discrete ectodermic territories (Fig. 1A-C), on the surface of the developing arms, mantle, funnel and in an area located between the eyes and the mantle (named 'h' zone, Fig. 1). As development proceeds, the tissues that express *Sof-Pax37* develop and join to finally cover almost the entire outer

surface of the pre-hatching embryo (Fig. 1D-F for the ventral side; Fig. 1G-I for the dorsal side). Thin sections confirmed that these *Sof-Pax37* positive tissues correspond to the ectoderm layer and to the final outer juvenile skin (Fig. 1J-M). Interestingly, *Sof-Pax37* expression was not found in the ectodermic tissues that eventually become internalized, like the shell sac that will form the shell (Fig. 1A, A'), or the anterior optic chambers that latter surround the optic lobes (a, b, c, d zones in Fig.1). Similarly, ectoderm that gives rise to internalized regions of skin in the juvenile (e.g. skin of the pallear cavity and inside the funnel) never showed any *Sof-Pax37* expression (white arrowheads in Fig. 1J, M).

Differential patterns of *Sof-Pax37* expression throughout the embryonic ectoderm reveal that the ontogeny of the juvenile head skin issues from two embryologic origins: the arms and the 'h' zone (see Fig.1). The *Sof-Pax37* positive tissues of the embryonic arms correspond to their future outer surfaces (opposite to the sucker side). From stage 21-22, these tissues also give rise to ectodermal areas of *Sof-Pax37* expression ("arm pillars") that progress over the head surface. Ipsilaterally, arms 1, 2 and 3 provide ectodermic tissues that create a common dorsal arm pillar (in green in Fig. 1G-I', K) and arms 4 and 5 participate in a separate common ventral arm pillar (in blue in Fig. 1E'-F'). On both ventral and dorsal sides of the head, the four arm pillars progress laterally over the *Sof-Pax37* negative ectodermal areas and finally cover the eyes (Fig.1 E-F, Fig. 1G-H, Fig. 1L). On each side, the ventral and dorsal arm pillars join laterally over the eyes and form a final outer eye layer, the superior lid (or "cornea"). The positive 'h' zone corresponds to the posterior connective region of the eye lid (Naef, 1928). This tissue develops from posterior to anterior and finally joins the two lateral arm pillars to finalize the eye lid (Fig. 1I-I'). As a result, all ectodermal tissues of the head region that did not themselves express the *Sof-Pax37* (areas a, b, c, d, f, g, Fig. 1E-H, L) are finally covered by the *Sof-Pax37* positive tissues derived from the arms and posterior eye lid (the 'h' zone). These tissues correspond to the future anterior optic chambers tissues surrounding the optic lobe inside the head.

Sof-Pax37 is also expressed in the mantle ectodermal layer at stage 15-16 with the exception of the region which eventually forms the internal shell sac (Fig. 1A-A'). Once the shell sac is internalized (at around stage 18), *Sof-Pax37* expression persists in the mantle skin until hatching (Fig. 1A-I, M), with isolated cells showing a more intense staining all over the mantle surface from stage 19 (see Fig. 1D). The skin of the pallear cavity shows no staining (see white arrowhead in Fig. 1M). Finally, *Sof-Pax37* is also expressed in the outer surface of the developing funnel tube (Fig. 1A-F), while the inner skin of the funnel tube shows no *Sof-Pax37* expression (white arrowhead in Fig. 1J).

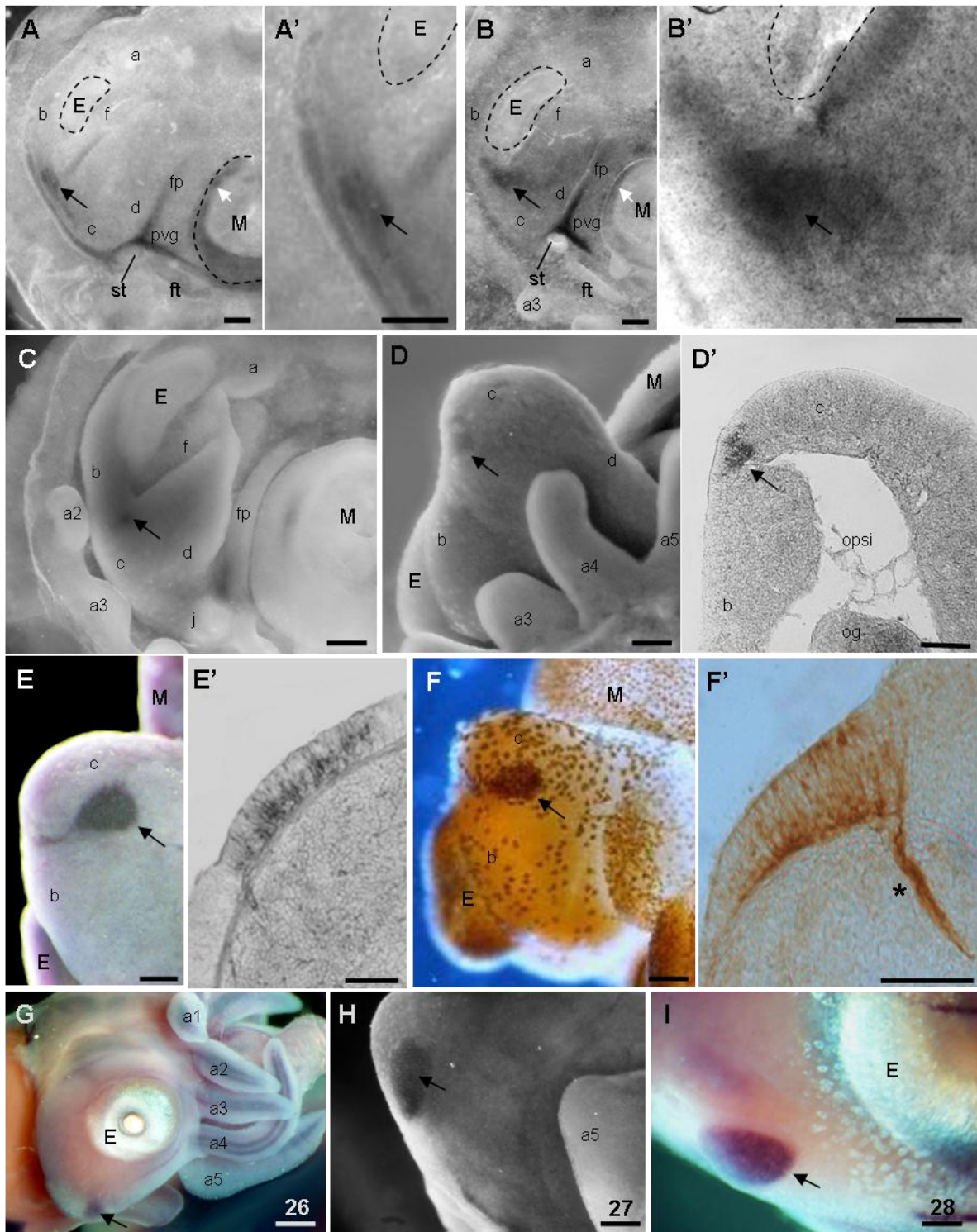


Figure 2. *In toto* and section views of the olfactory area in *S. officinalis* embryos from stage 16 to stage 30 labelled by *Sof-elav1* *in situ* hybridization or by immunochemistry against tyrosylated alpha-tubulin. A-A': apical views of stage 16 embryo: the palliovisceral territories (pvg) and the future olfactory area (arrow) are stained. B-B': apical views of stage 17 embryo, with *Sof-elav1* positive cells of the future olfactory area (arrow), under the optic vesicle. C: olfactory area expressing *Sof-elav1* at stage 20 (arrow). D-D': ventral view of the olfactory area at stage 23 showing a cluster of *Sof-elav1* positive cells (arrow), *in toto* view (D) and section view (D'). E-E': ventral view of the olfactory organ expressing *Sof-elav1* at stage 24 (arrow), *in toto* view (E) and section view (E'). F-F': ventral view of the olfactory organ (arrow) stained by immunochemistry against tyrosylated alpha-tubulin, *in toto* view (F) and section view (F') showing the olfactory nerve (asterisk). G-I: various views of embryonic olfactory organs (arrows) expressing *Sof-elav1* at respectively stages 26, 27 and 28. Orientation: for apical views (A-C), future dorsal side is up, future ventral side is down; for lateral views (D-I), anterior is down (or right in G and I). Scale bars represent 200 μ m. a, b, c, ...: marks of various points on the developing embryo (see figure 1); a1, a2, a3, a4 and a5: arms 1 to 5; E: eye; fp: funnel pouch; ft: funnel tube; M: mantle; np: neuropil; opsi: optic sinus; pvg: palliovisceral ganglion; st: statocyst.

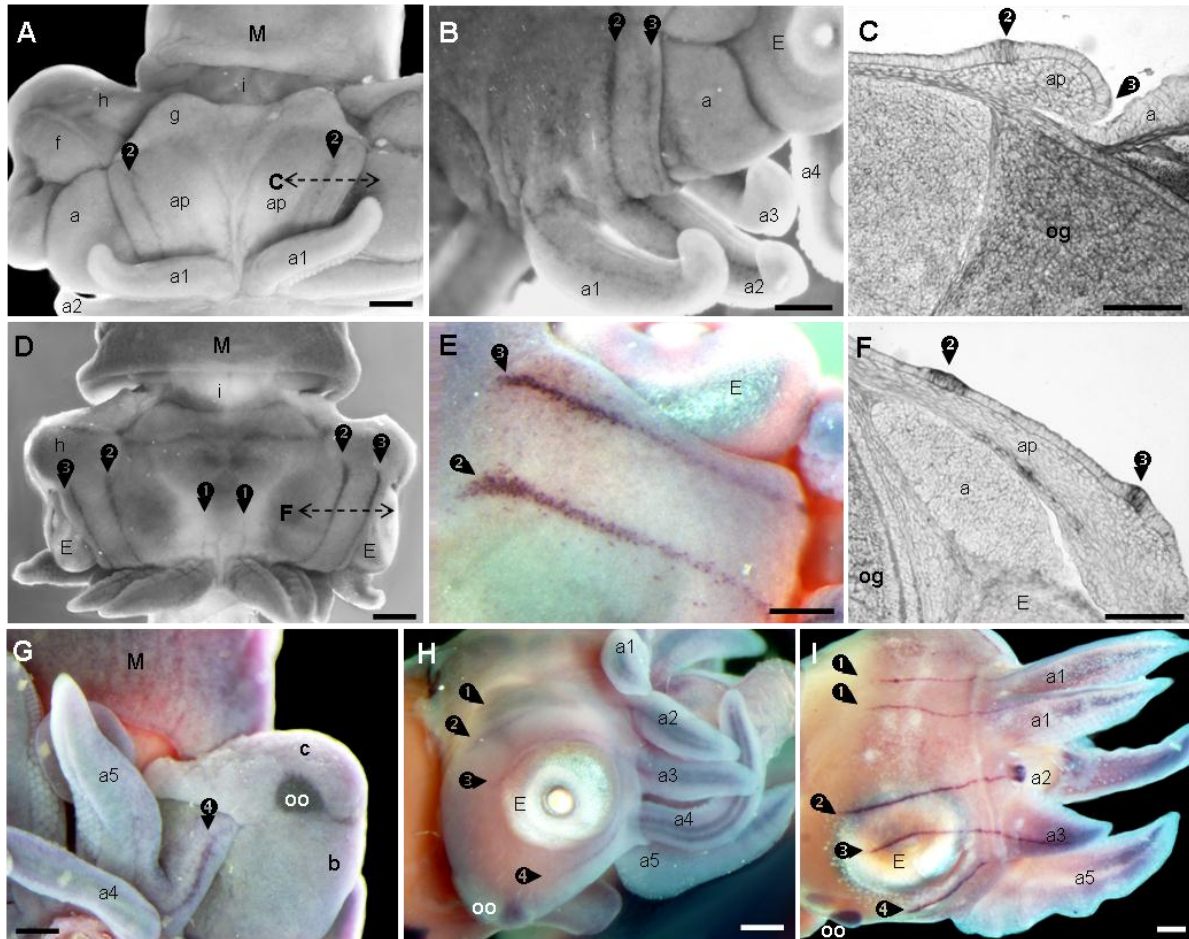


Figure 3. *In toto* and section views of the developing lateral lines of *S. officinalis* embryos from stage 24 to stage 30, labelled by *Sof-elav1* *in situ* hybridization. A: emerging lateral lines 2 on the dorsal side of the head of a stage 24 embryo; B: emerging lateral lines 3 on the dorsal side of the head of a late stage 24 embryo. The lateral lines 2 are prolonged along the upper surface of the arms 2; C- thin section (see A for location) through the left arm pillar (ap) and the developing lateral lines 2 and 3 at stage 24. D: dorsal head surface at stage 25 showing the well developed lateral lines 2 and 3 and both emerging lateral lines 1, facing arms 1. E: focus on the left lateral lines 2 and 3 at stage 25; F- thin section (see D for location) through the left arm pillar and the developing lateral lines 2 and 3 at stage 25; G: ventral head surface at stage 24 showing the right developing lateral line 4, prolonging the upper surface of the arm 4; H-I: lateral view (anterior is right) of the head of embryos at respectively stages 26 and 30, showing lateral lines 1 to 4. Orientation: for ventral and dorsal view (A-G), posterior is up, anterior is down. Scale bars represent 200 μm . a, b, c, ...: marks of various points on the developing embryo (see figure 1); a1, a2, a3, a4 and a5: arms 1 to 5; ap: arm pillar; E: eye; M: mantle; og: optic ganglion; oo: olfactory organ.

Sof-elav1 expression during development of the olfactory organs, lateral lines and isolated sensory cells in the skin

Two small clusters of ectodermal cells start expressing *Sof-elav1* at stage 16 in a region of *Sof-Pax37* negative tissue located posterior to the eye vesicles (Fig. 2A-B, A'-B'). At this stage, other *Sof-elav1* positive ectodermal cells can only be detected on the mantle edge (Fig. 2A-B). While the optic areas of the head develop and change in form, these clusters grow and remain *Sof-elav1* positive (Fig. 1C-D'). At stages 23 and 24, the embryo has attained a juvenile morphology and the two positive clusters have reached the definitive positions of the olfactory organs, located ventrally and posterior to the eyes (Fig. 2E-E'). The *Sof-elav1* positive cells of these clusters differentiate as neurons whose axons were labelled by immunocytochemistry against acetylated-tubulin (Fig. 2F-F'). The *Sof-elav1* expression persists

in the olfactory organ until hatching (Fig. 2G-I). As the arm pillars (*Sof-Pax37* positive tissues) develop and progress above the *Sof-Pax37* negative ectoderm, an ectodermic opening – the olfactory pit – is delineated that supplies a direct communication between the olfactory organs and the surrounding water (see Fig. 5A-C).

The lateral lines emerge at the surface of the developing arm pillars, even before they have reached their final extent over the eyes. The first lateral lines to differentiate – as revealed by the *Sof-elav1* expression of their constitutive cells – are those on arm 2 at stage 24 (Fig. 3A) and soon after the lateral lines of arm 3 (Fig. 3B-C). On the dorsal side of the head, the lateral lines of arm 1 appear at stage 25, when lateral lines 2 and 3 are well differentiated (Fig. 3D-F). On the ventral side of the head, the lateral

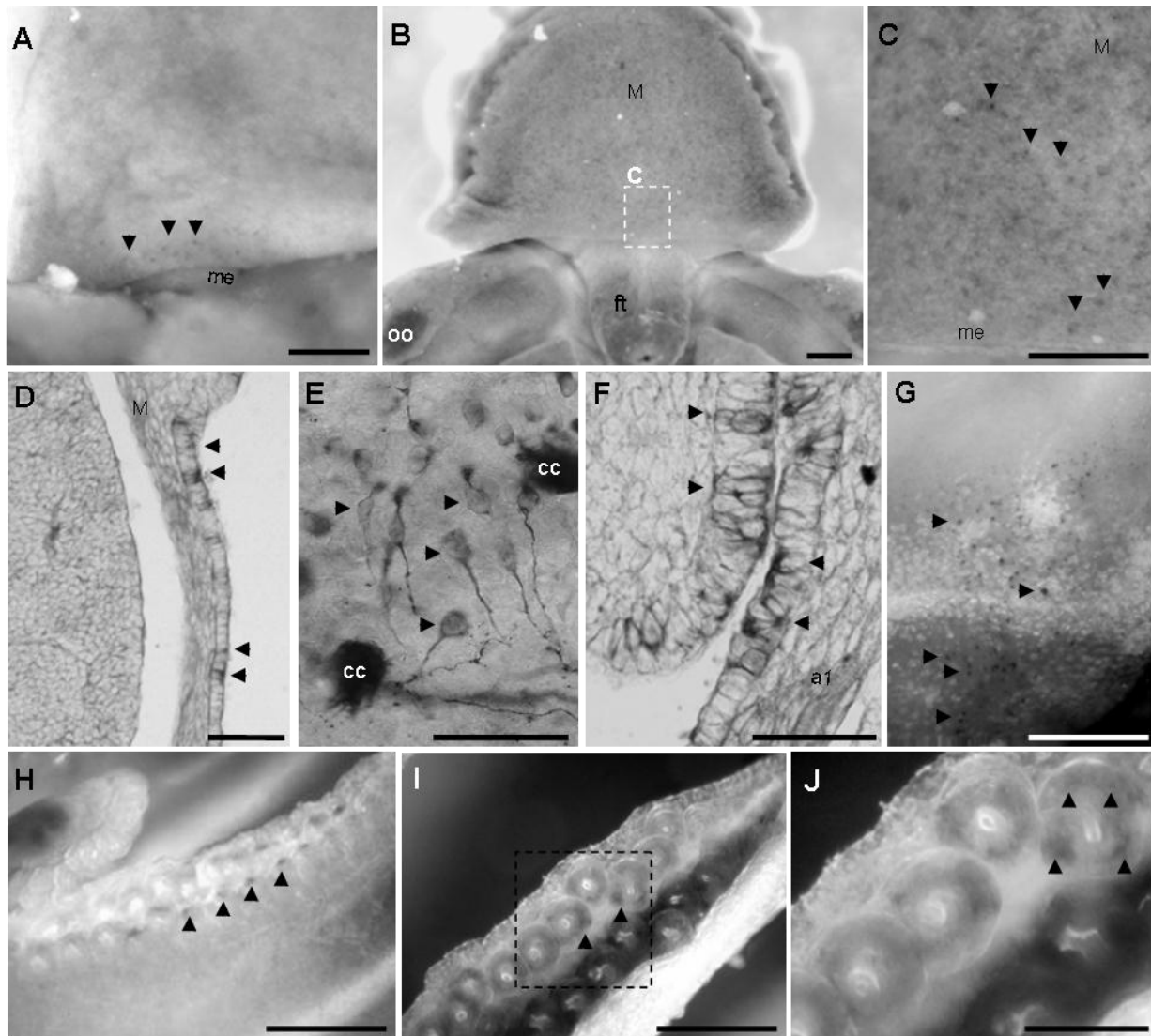


Figure 4. *In toto* and section views of the skin of *S. officinalis* embryos from stage 24 to stage 30, labelled by *Sof-elav1 in situ* hybridization or by immunocytochemistry against tyrosylated alpha-tubulin. A: ventral side of the mantle of a stage 24 embryo with the first positive *Sof-elav1* cells, future sensory cells, located at mantle edge; B: ventral side of the mantle of a stage 25 embryo with numerous epithelial primary sensory cells, *Sof-elav1* positive; C: focus on an area next to the mantle edge at stage 24 (see B for location) and numerous positive *Sof-elav1* cells (arrowheads). D: thin section through the lateral side of the mantle at stage 25 with a few *Sof-elav1* positive cells (arrowheads); E: sensory cells (arrowheads) within the ventral mantle skin of a stage 25 embryo, labelled by immunocytochemistry against tyrosylated alpha-tubulin (in addition to non-nervous ciliated cells (cc)); F: thin section through arm 1 and head skin at stage 25, with epithelial primary sensory cells expressing *Sof-elav1* (arrowheads); G: dorsal head skin of a stage 30 embryo with epithelial primary sensory cells expressing *Sof-elav1* (arrowheads); H-J: *in toto* views of the developing arm 3 suckers in a *S. officinalis* embryo at stage 28, labelled by *Sof-elav1 in situ* hybridization and showing isolated positive cells (arrowhead). Orientation: posterior is up, anterior is down. Scale bars represent 200 μm . a1: arm 1; cc: ciliated cells; M: mantle; me: mantle edge; oo: olfactory organ.

lines of arm 4 appear at stage 24 (Fig. 3G). No lateral line was ever found on the head and extending into arm 5. As the arm pillars reach their final extent, lateral lines 2, 3 and 4 elongate towards the eyes (Fig. 3H-I).

Over the developing epidermis of the whole embryo, isolated primary sensory neurons become visible at around stages 24-25, as they start expressing *Sof-elav1*. On the mantle, the first sensory neurons differentiate on the mantle edge at stage 24 (Fig. 4A), and then

sensory neurons develop all over the mantle epidermis (Fig. 4B-D). Processes from these cells also form a dense network of axons as revealed by immunostaining against acetylated alpha-tubulin (Fig. 4E). On the head, sensory neurons only develop on the arm pillars surface (Fig. 4F). Then, as the arm pillars cover the head and begin to form the juvenile epidermis, isolated sensory neurons can be found all over the head (Fig. 4G). Sensory neurons can also be found on the sucker rings when they start expressing *Sof-elav1* at around stage 28 (Fig. 4H-J). Confocal

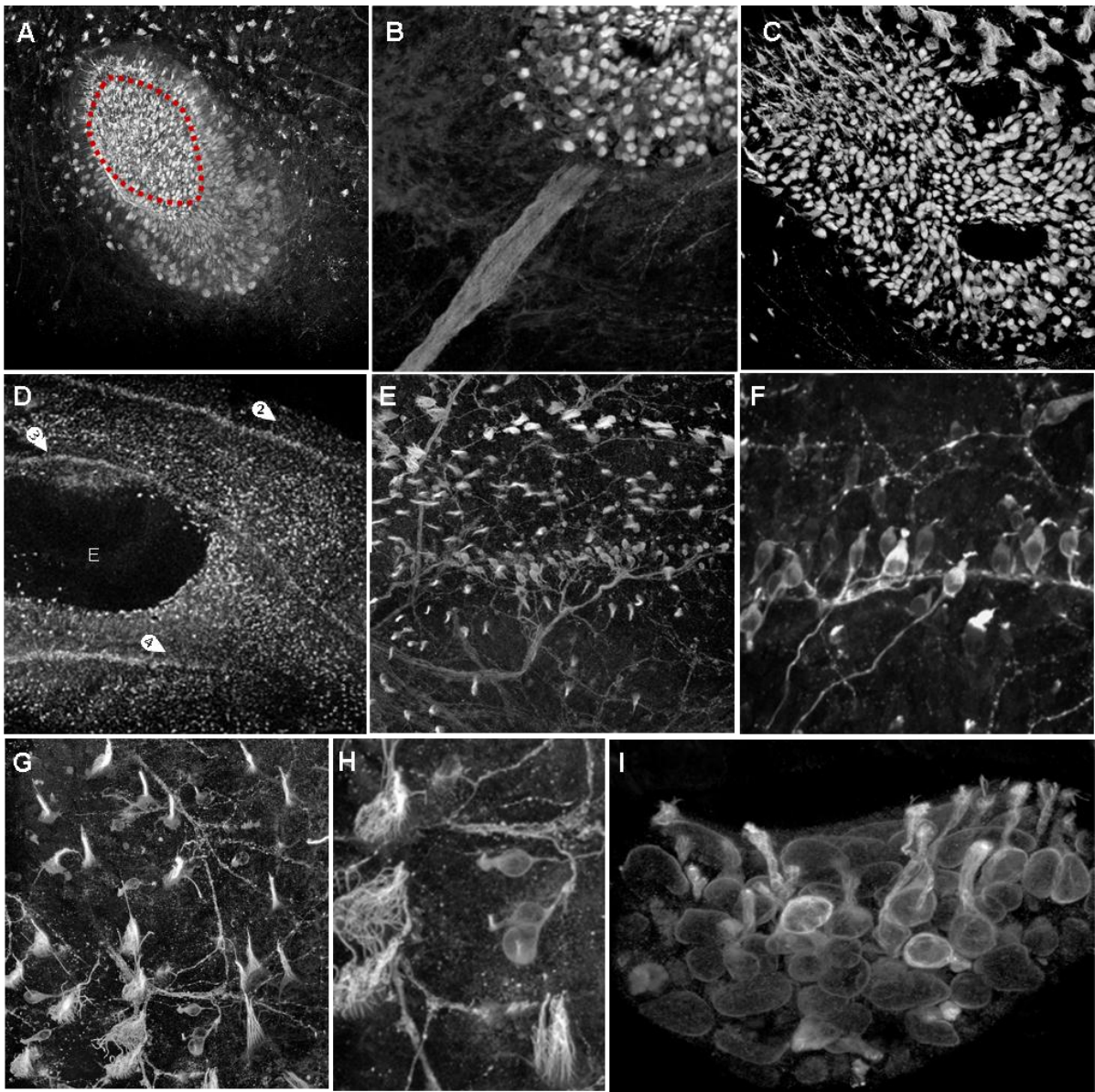


Figure 5. Confocal views of the main skin sensory structures of *S. officinalis* embryos (stage 30), stained with the anti alpha-tubulin antibody DM1A. A-C: views of the right olfactory organ in a stage 30 embryo (the red dotted line points out the opening of the olfactory pit); D-F: views of lateral lines 2, 3 and 4 around the right eye of a stage 30 embryo (E and F: details); G-H: views of skin sensory neurons on the mantle skin of a stage 30 embryo; I: sensory neurons in a sucker (stage 30).

microscopy provided more detailed views of the various sensory cells labelled with the broad spectrum DM1A antibody against alpha-tubulin (Fig. 5)

DISCUSSION

As we investigated the role of *Sof-Pax37* in the developing nervous system of *S. officinalis*, we unexpectedly discovered that *Sof-Pax37* was expressed in very distinct ectodermic territories of the embryo and that these territories ultimately expand and become all the juvenile outer skin (Fig 1). For now, we ignore what is the specific function of *Pax37* in this developmental process (maybe a potential link between the involvement of the vertebrate *Pax3* in melanocytes development and chromatophores of cephalopods, Le Douarin and Kalcheim 1999). Be that as it may, this specific staining can be used to identify the future outer skin of the juvenile and to follow its developmental dynamic. We show here that

not all the ectodermic surface of the *S. officinalis* embryo become the juvenile epidermis. For instance, we here demonstrate clearly that the head skin is anteriorly made of arm-originating epidermis (Fig1) as it was partially suggested by former studies (Arnold 1984; Boletzky 2003; Shigeno et al. 2008). Both olfactory organs early differentiate within a non-*Pax37* ectodermic territory next to the future anterior chamber organs (a, b, c, d, zones) that will ultimately be covered by the skin layer. As the arm pillars invade this area and cover the head, two small epidermal pits (or nostrils) are formed that provides an access for the olfactory cells to the outer environment (Fig. 5A).

The future sensory structures of the juvenile skin –lateral lines and isolated sensory cells– consistently develop within *Pax37*-positive tissues. The mechanoreceptive neurons of the lateral lines express *Sof-elav1* and differentiate from stage 24, as the arm pillars of arms 1, 2, 3 and 4 start extensions (Fig. 3). The setting up of lateral lines is thus directly

associated to the dermic progression of the *Sof-Pax37* positive arm pillar skins all over the anterior head surface. This skin forms the eye lids and the lateral lines 4 finally cover the eyes (Fig. 3I). Concerning the future sensory cells of the epidermis, first detectable *Sof-elav1*-positive cells were observed at stage 24 (Fig. 4). In the mantle area, however, the diffuse *Sof-elav1* staining at stages 16 and 17 (see white arrowhead at the mantle edge, Fig. 2A-B) probably corresponds to the differentiation of the few early neurons we described previously (Baratte and Bonnaud 2009).

Interestingly, the first ectodermal structures in which a *Sof-elav1* expression was detected in *S. officinalis* embryo are the two future olfactory organs, at around stage 16 (Fig 2A). *Sof-elav1* is a member of the *elav/hu* family and one of the first genetic markers of post-mitotic neuroblasts in many metazoans (see Buresi et al. 2013), this early expression during organogenesis thus indicates that olfactory organs are the first sensory structures that develop and differentiate in the *S. officinalis* embryo. Accordingly, in most cephalopods species, olfactory organs are detected in early stages of organogenesis at around stage 21, as reported by histological and ultrastructural studies based on the recognition of their typical flask-shaped ciliated sensory cells (Fig.5A-C; Naef 1928, Wildenburg and Fioroni 1989, Woodhams and Messenger 1974; Emery 1975, 1976). The continuous and global expression of *Sof-elav1* in the developing olfactory organs until hatching further suggests that most of the olfactory cells differentiate, which may explain the negative allometric growth of these organs compared to the whole embryo (Wildenburg and Fioroni 1989).

At the very first stages of organogenesis, we did not detect any unpaired and median *Sof-elav1* expression pattern -in the mouth or in the cerebral area- which could have suggested a kind of homologous or vestigial “apical sensory organ” (ASO) in the *S. officinalis* embryo. However, it remains interesting to note that the first sensory structures that develop in cephalopods are also olfactory structures, just like the ASO of other mollusc larvae (see Croll and Dickinson 2004). The early olfactory abilities that *S. officinalis* embryos exhibit from stage 23 (Romagny et al. 2012) could be explained by the early differentiation of the olfactory organs, even if their involvement remains to be demonstrated. In *Nautilus sp.*, two rhinophores are homologized to the olfactory organs (Shigeno et al. 2008), but it still remains difficult to evaluate their differentiation in these long-developing species.

At the time of olfactory organ differentiation, the palliovisceral gangliogenic territories are the first ganglia to show massive neuronal differentiation (as indirectly shown by massive *Sof-elav1* expression, Fig2A, Buresi et al. 2013). It could be therefore hypothesized that both structures get somewhat connected. In adults of *Octopus vulgaris*, it has been described that around 1000

nerve fibers from each olfactory organ are connected to their ipsilateral olfactory lobe, located between the optic lobes and the brain, in the optic tract area (Woodhams and Messenger 1974; Boycott and Young 1956). The embryonic origin of the olfactory lobe is unknown, so a potential link with the palliovisceral ganglia (forming the most posterior part of the adult brain) remains possible. An extensive immuno-histochemistry study is currently conducted in embryos and juvenile of *S. officinalis* to describe the fine network of olfactory afferents, as it has been performed with the rhinophores and tentacles in other molluscs species (in larvae: Bonar 1978; Dickinson and Croll 2003, Wollesen et al. 2007; in adults: Emery 1992; Moroz et al. 1997, Boudko et al. 1999, Croll 2001, Croll et al. 2003, Moroz 2006, Wollesen et al. 2007).

We demonstrate here that the main chemical and tactile sensory structures of the juvenile *S. officinalis* have to two distinct embryonic origins: both olfactory organs develop within a primordial head ectoderm that will be ultimately covered by a final juvenile skin (Fig. 2); other sensory cells develop inside *Sof-Pax37*-positive and discrete ectodermic territories that will become the definitive juvenile skin (Fig. 3, 4). These discrete territories have two main locations: i) the mantle ectoderm, which is already at its final location and in which sensory cells can even differentiate in early stages of organogenesis (Baratte and Bonnaud 2009); ii) the arm pillar ectoderm, which spreads and extends over the head surface from stage 22, and in which sensory cells develop between stage 24 to hatching, as most of the other skin structures, iridophores (Andouche et al. 2013) and chromatophores (Bassaglia et al. 2013). The movements of the arm pillar ectoderm, that *Sof-Pax37* expression underlines here, should be the object of a specific future histological study. This process interestingly parallels an event observed during the metamorphosis of gastropods: the spreading of epidermis from the larval foot over the entire body (Bonar 1972, 1976). Since the cephalopod arms are hypothesized to have a pedal origin (Boletzky 2003), the arm pillars may illustrate an ancestral molluscan ontogenetic feature conserved in cephalopods. With the differentiation of early sensory neurons (Baratte and Bonnaud 2009) and the early differentiation of olfactory organs (present study), this will be an additional puzzling similarity between indirect-developing molluscs and direct-developing cephalopods.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank J. Henry and L. Dickel (University of Caen), S. Henry, L. Lévêque and X. Baily (Roscoff Biology Station – UPMC) for providing biological materials.

REFERENCES

- Andouche A, Bassaglia Y, Baratte S, Bonnaud L. (2013) Reflectin genes and development of iridophore patterns in *Sepia officinalis* embryos (Mollusca, Cephalopoda). *Dev Dyn.* 242: 550-61.
- Arnold JM. (1984) Closure of the squid cornea: a muscular basis for embryonic tissue movement. *J Exp Zool.* 232: 187-195.
- 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.
- 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.
- 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.
- Bassaglia Y, Buresi A, Franko D, Andouche A, Baratte S, Bonnaud L. (2013) *Sepia officinalis*: a new biological model for eco-evo-devo studies. *J Exp Mar Biol Ecol*, in press.
- Boletzky S. (1988) Characteristics of cephalopod embryogenesis. in *Cephalopods - Present and Past* (ed. Wiedmann, J.K., J.), pp. 167-179 Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Boletzky S. (1989) Recent studies on spawning, embryonic development, and hatching in the Cephalopoda. *Adv Mar Biol* 25: 85-115.
- Boletzky S. (2003) Biology of early life stages in cephalopod molluscs. *Adv Mar Biol.* 44: 143-203.
- Bonar DB. (1972) Fate of larval organs at metamorphosis in a gastropod. *American Zoologist* 12: 722.
- Bonar DB. (1976) Molluscan metamorphosis: a study in tissue transformation. *American Zoologist* 16: 573-591.
- Bonar DB. (1978) Ultrastructure of a cephalic sensory organ in larvae of the gastropod *Phestilla sibogae* (Aeolidacea, Nudibranchia). *Tissue Cell* 10: 153-165.
- Boycott BB, Young JZ (1956) The subpedunculate body and nerve and other organs associated with the optic tract of Cephalopods. Bertil Hanstrom Zoological Papers, 76-105.
- Boudko DY, Switzer-Dunlap M, Hadfield MG. (1999) Cellular and subcellular structure of anterior sensory pathways in *Phestilla sibogae* (Gastropoda, Nudibranchia). *J Comp Neurol.* 403: 39-52.
- Budelmann BU, Bleckmann H. (1988). A lateral line analogue in cephalopods: water waves generate microphonic potentials in the epidermal head lines of *Sepia* and *Lolliguncula*. *J Comp Physiol A.* 164: 1-5.
- Budelmann BU (1996). Active marine predators: the sensory world of cephalopods. *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* 27: 59-75.
- Buresi A, Baratte S, Da Silva C, Bonnaud L. (2012) orthodenticle/otx ortholog expression in the anterior brain and eyes of *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda). *Gene Expr Patterns.* 18: 109-116.
- Buresi A, Canali E, Bonnaud L, Baratte S. (2013) Delayed and asynchronous ganglionic maturation during cephalopod neurogenesis as evidenced by *Sof-elav1* expression in embryos of *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda). *J Comp Neurol.* 521: 1482-1496.
- Campos AR, Rosen DR, Robinow SN, White K. (1987). Molecular analysis of the locus *elav* in *Drosophila melanogaster*: a gene whose embryonic expression is neural specific. *EMBO J* 6: 425-431.
- Croll RP. (2001) Catecholamine-containing neurones in the central nervous system and periphery of *Aplysia californica*. *Journal of Comparative Neurology.* 441: 91-105.
- Croll RP, Boudko DY, Pires A, Hadfield MG. (2003) Transmitter contents of cells and fibers in the cephalic sensory organs of the gastropod mollusc *Phestilla sibogae*. *Cell Tissue Res.* 314: 437-48.
- Croll RP. (2006) Development of embryonic and larval cells containing serotonin, catecholamines and FMRFamide-related peptides in the gastropod mollusc *Phestilla sibogae*. *Biol Bull.* 211: 232-247.
- Croll RP, Voronezhskaya EE. (1996) Early elements in gastropod neurogenesis. *Dev Biol* 173: 344-347.
- Croll RP, Dickinson AJG. (2004) Form and function of the larval nervous system in molluscs. *Invert Reprod Dev* 46: 173-187.
- Darmaillacq AS, Lesimple C, Dickel L. 2008. Embryonic visual learning in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Anim Behav* 76: 131-134.
- Denes AS, Jékely G, Steinmetz PR, Raible F, Snyman H, Prud'homme B, Ferrier DE, Balavoine G, Arendt D. (2007). Molecular architecture of annelid nerve cord supports common origin of nervous system centralization in bilateria. *Cell.* 129: 277-288.
- Dickinson AJG, Nason J, Croll RP. (1999) Histochemical localization of FMRFamide, serotonin, and catecholamines in embryonic *Crepidula fornicate* (Gastropoda, Prosobranchia). *Zoomorphology* 119: 49-62.
- Dickinson AJ, Croll RP. (2003) Development of the larval nervous system of the gastropod *Ilyanassa obsoleta*. *J Comp Neurol.* 466: 197-218.
- Emery DG. (1975) The histology and fine structure of the olfactory organ of the squid *Lolliguncula brevis* Blainville. *Tissue Cell* 7: 357-367.
- Emery DG. (1976) Observations on the olfactory organ of adult and juvenile *Octopus joubini*. *Tissue Cell* 8:33-46.

- Emery DG. (1992) Fine structure of olfactory epithelia of gastropod molluscs. *Microsc Res Tech*. 22: 307-324.
- Fioroni P. (1990) Our recent knowledge of the development of the cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Zool Anz* 224: 1-25.
- Graziadei PPC. (1964) Receptors in the sucker of the cuttlefish. *Nature Lond* 195: 57-59.
- Komack S, Boal JG, Dickel L, Budelmann BU. (2005) Behavioral responses of juvenile cuttlefish (*Sepia officinalis*) to local water movements. *Mar Freshw Behav Physiol* 38 : 117-125.
- Le Douarin NM, Kalcheim C. (1999) *The Neural Crest 2nd edn*. New York, NY: Cambridge University Press.
- Lemaire J. (1970) Table de développement embryonnaire de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). *Bull Soc Zool* 95: 773-782.
- 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.
- Mackie GO. (2008) Immunostaining of peripheral nerves and other tissues in whole mount preparations from hatchling cephalopods. *Tissue Cell* 40: 21-29.
- Marlow HQ, Srivastava M, Matus DQ, Rokhsar D, Martindale MQ. (2008) Anatomy and development of the nervous system of *Nematostella vectensis*, an anthozoan cnidarian. *Dev Neurobiol* 69: 235-254.
- Marquis F. (1989) Die Embryonalentwicklung des Nervensystem von *Octopus vulgaris* Lam. (Cephalopoda, Octopoda), eine histologische Analyse. *Verhandl Naturf Ges Basel* 99: 23-75.
- Moroz LL, Sudlow LC, Jing J, Gillette R. (1997) Serotonin-immunoreactivity in peripheral tissues of the opisthobranch molluscs *Pleurobranchaea californica* and *Tritonia diomedea*. *J Comp Neurol*. 382: 176-188.
- Moroz LL. (2006) Localization of putative nitrenergic neurons in peripheral chemosensory areas and the central nervous system of *Aphysia californica*. *J Comp Neurol*. 495: 10-20.
- Naef A. (1928) Die Cephalopoden. Embryologie. *Fauna Flora Golf Neapel*, vol. 35, p. 1-357.
- 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.
- Romagny S, Darmaillacq AS, Guibé M, Bellanger C, Dickel L. (2012) Feel, smell and see in an egg: emergence of perception and learning in an immature invertebrate, the cuttlefish embryo. *J Exp Biol*. 215: 4125-4130.
- Sakakibara S, Imai T, Hamaguchi K, Okabe M, Aruga J, Nakajima K, Yasutomi D, Nagata T, Kurihara Y, Uesugi S, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Okano H. (1996) Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev Biol* 176: 230-242.
- 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.
- Shigeno S, Sasaki T, Moritaki T, Kasugai T, Vecchione M, Agata K. (2008) Evolution of the cephalopod head complex by assembly of multiple molluscan body parts: Evidence from *Nautilus* embryonic development. *J Morphol* 269: 1-17.
- Shigeno, S. Takeno, S. Boletzky, S. (2010). The origins of cephalopod body plans: A geometrical and developmental basis for the evolution of vertebrate-like organ systems. Tanabe, K., Shigeta, Y., Sasaki, T. & Hirano, H. (eds.) *Cephalopods - Present and Past*. Tokai University Press, Tokyo, p. 23-34.
- Sundermann G. (1983). The fine structure of epidermal lines on arms and head of postembryonic *Sepia officinalis* and *Loligo vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda). *Cell Tissue Res*. 232: 669-677.
- Sundermann-Meister vG. (1978) A new type of ciliated cells in the epidermis of late embryonic stages and juveniles of *Loligo vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda). *Zool Jb Anat Bd* 99: 493-499.
- Voronezhskaya EE, Tyurin SA, Nezlin LP. (2002). Neuronal development in larval chiton *Ischnochiton bakodadensis* (Mollusca: Polyplacophora). *J Comp Neurol* 444:25-38.
- Voronezhskaya EE, Nezlin LP, Odintsova NA, Plummer JT, Croll RP. (2008). Neuronal development in larval mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia). *Zoomorphology* 127:97-110.
- Wanninger A, Haszprunar G. 2003. The development of the serotonergic and FMRFamergic nervous system in *Antalis entalis* (Mollusca, Scaphopoda). *Zoomorphology* 122:77-85.
- Wildenburg G, Fioroni P. (1989) Ultrastructure of the olfactory organ during embryonic development and at the hatchling stage of *Loligo vulgaris* Lam. *J. Ceph. Biol.* 1: 56-70.
- Wollesen T, Wanninger A, Klussmann-Kolb A. (2007). Neurogenesis of cephalic sensory organs of *Aphysia californica*. *Cell Tissue Res*. 330: 361-379.
- Wollesen T, Cummins SF, Degnan BM, Wanninger A. (2010) FMRFamide gene and peptide expression during central nervous system development of the cephalopod mollusk, *Idiosepius notoides*. *Evol Dev* 12: 113-130.
- Woodhams PL, Messenger JB. (1974) A note on the ultrastructure of the *Octopus olfactory* organ. *Cell Tissue Res*. 152: 253-258.
- Yamamoto M, Shimazaki Y, Shigeno S. (2003) Atlas of the embryonic brain in the pygmy squid, *Idiosepius paradoxus*. *Zoolog Sci* 20: 163-179.

ARTICLE 4

Bassaglia, Y., **Buresi, A.**, Franko, D., Andouche, A., Baratte, S., Bonnaud, L.. *Sepia officinalis*: a new model for eco-evo-devo studies. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* (in press)

Sepia officinalis: a new model for eco-evo-devo studies

Y. Bassaglia^{1,3}, A. Buresi¹, D. Franko^{1,2}, A. Andouche¹, S. Baratte^{1,4} and L. Bonnaud^{1,2}

¹Muséum National d'Histoire Naturelle, DMPA, Lab. BOREA. UMR MNHN CNRS 7208-IRD 207-UPMC

²Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

³Univ. Paris Est Créteil - Paris 12, Paris, France

⁴Univ. Paris Sorbonne - Paris 4, Paris, France

Abstract

Including lophotrochozoan models in Eco-Evo-Devo field is crucial to elaborate hypotheses on structures and functions evolution. The structures and functions and the environmental relationships are studied by the mean of a developmental approach considered in a “short term” context (and thus including processes of ecological adaptation = tolerance) and in a “long term” context as a consequence of the first, gaining information about processes of selective evolution.

Sepia officinalis has been chosen for its particularities: a direct development, a nervous system allowing learning abilities, a brachial crown and funnel (derived from the foot) and an internal calcareous shell; this species also shows complex body patterning. These characteristics have been selected probably because they confer adaptive advantages for its necto-benthic mode of life. Several axes can be considered 1) the spatio-temporal organisation of the body that takes place by a direct development 2) the neuro-muscular complex, 3) the body coloured patterns and the visual structures, linked to the neural network responsible of the complex behaviour.

By the characterisation of the expression of target genes indentified thanks to our ESTs library, we gain insights about their role during the development of *Sepia*. Although the general features of the genes are conserved within metazoans, their role in *S. officinalis* is often different from those described in other species. Most studied genes show extended or restricted expression in the developing morphological novelties, other unexpected expression, as in muscular structures for example. Moreover, the nervous system as well as the chromatophore network differentiate very early and largely before the brain is constituted, as well as the ability to perceive the environment. These studies enlighten the molecular pathway particularities of the cephalopod lineage. They underline the necessity to have a better evolutionary understanding of genetic structure/function relationships. Genome sequencing on cephalopod that possesses the highest genome among molluscs happens crucial for comparative genomics in lophotrochozoan lineages. *S. officinalis* being an ideally suitable eco-evo-devo model and because the ESTs data are increasing, we propose to sequence its genome.

Keywords: cephalopod, model, evo-devo, adaptation

Corresponding author: Bonnaud L.
Museum national d Histoire Naturelle
DMPA. UMR BOREA CNRS 7208- IRD 207-UPMC
55 rue Buffon. 75005 Paris. France.
Tel 33 1 40 79 53 48 Fax 33 1 40 79 34 61
Mail: bonnaud@mnhn.fr

1- Introduction

The eco-evo-devo field implies to combine the ecological situation (environmental constraints, adaptation) of the organism and its development in an evolutionary perspective: it is an integrative approach in the general context of metazoan evolution to understand the evolution of structures and functions and which mechanisms have driven the adaptive changes (Müller, 2007; Tauber, 2010). Historically, biological models belonging to ecdysozoans and vertebrates, such as *Drosophila*, *Caenorhabditis* or zebrafish, have been chosen in the field of evo-devo 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

model, although annelids and molluscs have been used for several decades in developmental investigations. Mollusc models are just emerging (Henry et al., 2010) in evo-devo field and must be developed, 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 in this lineage.

Cephalopods are now considered as valuable models in an evo-devo context for several reasons: they present anatomical convergent structures with vertebrates, such as the central nervous system (CNS), the brain, and sensorial structures such as the camerular eye. Their evolutionary and ecological interest is evidenced by their specificities within mollusc and their diversity of mode of life. They belong to molluscs but they show remarkable divergences with deep modifications of the body plan

organization. How it is possible to evolve from an ancestral mollusk through an ancestral cephalopod and which mechanisms have been selected during evolution is a crucial point in the understanding of cephalopod lineage characteristics.

From the typical molluscan design characterized by a shell produced by the mantle and a foot, coleoids show an internal and regressed shell and derived characters concerning the neuro-muscular complex. The evolutionary success and diversification of the coleoid group might result from a win-win evolutionary mechanism. The shell reduction varies between coleoids and occurs several times (Kröger et al., 2011). The loss of the external shell, which provides a physical protection against predators, could not occur without any concomitant adaptations, anatomical, neural, or behavioural, allowing a better protection. On a “long term” axe, we study anatomical and morphological adaptation, especially the derived characters concerning the nervous and muscular systems. The selective constraints because of the shell loss are concomitant of the evolution of both muscular and nervous structures. The mantle being very muscular, and the brachial crown and funnel derived from the molluscan foot are components of the characteristic locomotion by jet propulsion. In the lack of external protective shell, the uncovering of the body has permitted the evolution of 'chromatophores', colour-changing cells in the skin, which are important in many coleoids for communication or camouflage giving them adaptive advantage to escape predators in their biotope.

Studying the development allows to approach the evolutionary mechanisms that have driven these adaptive changes. Unlike other molluscs, cephalopods show a direct development that allows to follow all developmental stages and to access to molecular control without any modification due to metamorphosis. These peculiarities make of

cephalopod innovative model among lophotrochozoans and allow us to build evolutionary hypothesis concerning the emergence of these structures in relation to their life environment. Finally, they live in different biotope in oceanic ecosystem:

Sepia officinalis is a particularly suitable model in such integrative approach: it is an economically important species and the aquaculture is developing. *S. officinalis* is necto-benthic, considered as an intermediate mode of life, and possesses not only giant fibers allowing efficient propulsion but also chromatophores to hide. Its calcified shell is internal and assists with locomotion by facilitating buoyancy. Studying the development of *S. officinalis* allows to gain insights about the processes that have led during evolution to adaptive advantages in a particular necto-benthic ecosystem (environment). In Eco-Evo-Devo studies, we try to investigate the evolutionary (long term) axe, in and under the light of an historical perspective (short term ecological responses of individuals to environmental cues). To understand the setting up of derived characters such as internal shell, arms and funnel, muscular mantle and nervous system and infer evolutionary hypothesis about their emergence, we use a developmental approach considering the environment and the selective pressure that led especially to neuromuscular adaptations for locomotion and camouflage functions.

2-*Sepia officinalis*, a biological model

The cuttlefish *Sepia* has been chosen because of 1) its necto-benthic mode of life 2) the knowledge of its embryogenesis 3) the ease to collect eggs and to keep individuals in laboratory-controlled conditions) 4) hatchlings are benthic and use colour pattern for camouflage 5) the extensive knowledge of adult and

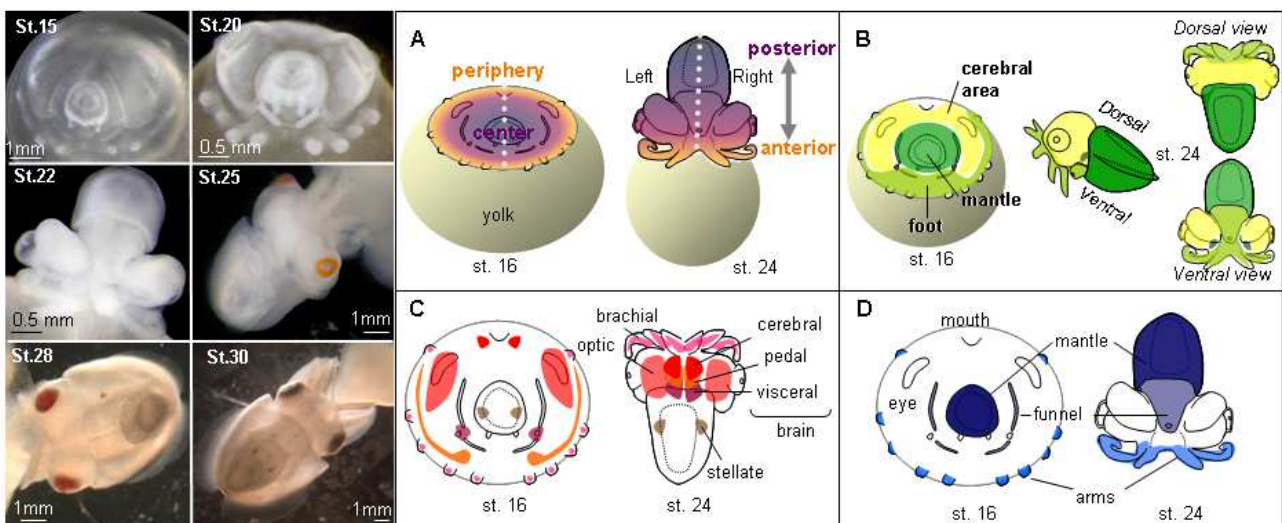


Figure 1. Main features of *Sepia officinalis* anatomy and development. Left: pictures of *Sepia* embryos at stages 15, 20, 22, 25, 28 and 30 near hatching (stages from Lemaire). Right: A-D Pictures of *Sepia officinalis* organogenesis illustrating the modification of body plan and the main structures. A: Orientation of anterior-posterior axis; B-Mollusc typical body plan C- Nervous territories D- Muscular territories.

juvenile nervous system and body-colour patterning.

Biological cycle

S. officinalis females lay eggs near the coast in spring. After the reproductive time, they die. Eggs are attached in batches and surrounded by black envelopes, probably protecting from light. The life span does not exceed two years, they reproduce one time only by cross-fertilization. In channel and Atlantic Ocean characterized by daily tides they are submitted to emersion and/or desalinated-raining waters. They develop in two to three months depending of the seawater temperature.

Development time and organogenesis (Fig. 1)

There is a fundamental developmental difference with other molluscs: the cleavage of cephalopod egg is discoidal, not spiral, and the development of sepia embryo is direct. There is no larval stage, no metamorphosis for all cephalopods. Nevertheless, in most of them although the hatchlings present a morphology and ecology different from that of adults leading to the word “paralarvae” as the transformation in cephalopod species with planktonic young is less dramatic than that observed in other groups (fishes or insects) (Villanueva and Norman, 2008). A contrario, in the cuttlefish, the newly hatched adopt the adult necto-benthic mode of life.

S. officinalis develops directly without metamorphosis. Zygote cleavage gives rise to a disk-shaped embryo at the animal pole of the egg, whereas the vegetal pole is made of a thin layer of ‘extra-embryonic’ ectoderm cells that covers the yolk. The organogenesis starts at a stage defined as the 14th (based on Lemaire, 1970 definition) and proceeds during 2 to 3 weeks (at 25°C), from stage 15 to hatching resulting in adult anatomy (Boletzky, 2006). Progressively, the embryo expands as all organs gain volume. The final adult arrangement is reached at stage 21, where the whole embryo straightens: Eyes, mouth, and the arm crown are then located at the yolk side corresponding to the oral (or anterior) pole of the future adult and the visceropallium (visceral mass, pallear cavity, and surrounding mantle) at the opposite side corresponding to the future aboral pole, posterior end of the adult. The muscular mantle, gills and the two paired components of the funnel, the pouches and the tube that join together at stage 23 to form the funnel are central. 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 coloration of the eyes and the skin is acquired concomitantly from stage 24-25.

Molecular data:

For several years ESTs libraries of species of Lophotrochozoan are increasing: in molluscs even if often established from a specific organ or cell type of interest. In cephalopods, ESTs libraries have been

elaborated from *Octopus* eye (Ogura et al., 2004), *Euprymna scolopes* light organ (Chun et al., 2006), *Loligo bleekeri* eye (Yoshida and Ogura, 2011), *Nautilus pompilius* eye (Yoshida and Ogura, 2011). The only ESTs library from organogenesis stages of a cephalopod embryo has been established for *Sepia officinalis* (Bassaglia et al., submitted). Thanks to these data, homologous genes, known in other metazoans to have a role in the neuro-muscular complex development, can be 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). Added to smooth and cross striated muscles known in vertebrates, a third class, obliquely striated muscles, is noticeable. Almost all muscles in cephalopods are obliquely striated but cross striated muscles have also been described in tentacles (Kier, 1985; 1991; 2003; Kier and Schachat, 2008); the presence of this type of muscle in the systemic heart is discussed (Budelmann, 1997; Kling and Schipp, 1987; Schipp and Schäfer, 1969).

In vertebrates, skeletal cross-striated muscle development depends of MRFs (Myogenesis Regulating Factors), a highly conserved family of four transcription factors: MyoD, myf-5, myogenin and MRF4 (myf-6) (review in 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 *Sepia officinalis* embryo from stage 26 (according to Lemaire, 1970) to hatching.

The development of cardiac muscle, the other type of striated muscle in vertebrates, depends on numerous different transcription factors (review in Bruneau, 2002; Brand, 2003; 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 pointed out in one late embryonic stage (Elliott et al., 2006). SoNK4 in *Sepia officinalis* is expressed in structures known to be particularly rich in muscles, namely arms and mantle, first and in later stages, in the funnel tube primordia but the funnel pouch primordia remained negative confirming the different embryological origin of these elements (Navet et al., 2008). All these structures belong to the hydrostat and are all involved in locomotion by jet propulsion (Kier, 1989; Kier and Thompson, 2003). The locomotory muscles (mantle, arms and funnel being derived from the molluscan typical foot.) are assimilated to the skeletal muscles of the vertebrates, which do not express NK4. NK4 could have been

recruited in this clade for the apparition of morphological novelties implicated in the locomotory function useful to escape, in the absence of protective shell.

Other transcriptions factors involved in myogenesis are known. In vertebrates, Pax3 and Pax7 genes are widely expressed in the somites of embryos, where they play distinct roles in muscle development especially in skeletal muscles. Pax3/7 has just been characterized in *Sepia* ESTs library (data not shown) and its involvement in muscles setting up has not yet been evidenced.

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 1) cephalopods are the only non-vertebrates to produce important quantity of serotonin, dopamine, and noradrenalin (Juorio, 1971; Messenger, 1996), 2) both antagonistic serotonergic and dopaminergic systems are essential in the control of locomotory function and movements as in mammals and 3) 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,b; Polak et al., 1991; Price and Goldberg, 1993; Nguyen et al., 2001; 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 characterise a cephalopod dopamine system with a putative dopamine D2-like receptor. DA has been evidenced in the sensory peripheral nervous system: in the statocysts (Budelmann and Bonn, 1982; Kime and Messenger, 1990; Williamson, 1989), in the olfactory organ (Lucero and Gilly, 1995), in the retina (Makman et al., 1987; Tasaki and Suzuki, 1980; Silver et al., 1983) and in the ink sac (Fiore et al., 2004).

In *Sepia* embryos, immunochemistry against 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. 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 envelopes.

In vertebrates, the differentiation of serotonergic and dopaminergic systems is controlled upstream by sonic hedgehog. *Shh* belongs to the hedgehog family and is a diffusible morphogen (Ingham and McMahon, 2001). In vertebrates and *Drosophila*, *Shh* is expressed in several regions of the brain (Krauss et al., 1993; Page, 2002) and control some genes such as Pax6 that has a dorsal role in the neural tube (sensory areas) and in the eyes. 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., 2001). Similarly, in *S. officinalis*, *shh* is expressed in tissues surrounding the whole optic area and in the sensory peripheral nervous system: in the arms (Navet et al., 2009), in statocysts and in the 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).

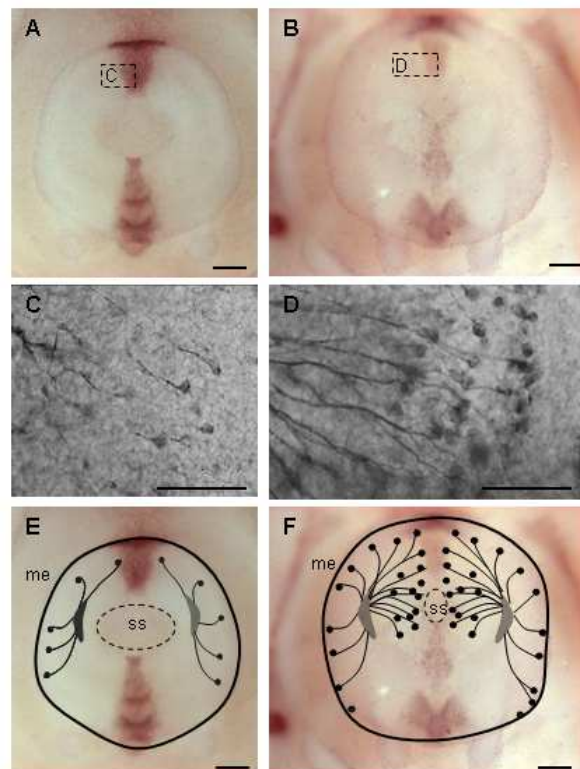


Figure 2. Shh expression (A, B) and TH immunostaining showing sensory cells (C, D) in the mantle area of *Sepia* embryos at stage 19 (left) and 21 (right). E, F: merged pictures of shh expression and schemes of sensory neurons networks at each stage. me: mantle edge; ss: shell sac. Scale bars: 400μm

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 responsible of the complex behaviour as soon as hatching is a good example of adaptation in a short (provide an adequate pattern to a situation) and long term (selection to an environment).

In present coleoids (octopus, squid and cuttlefish) skin patterning capabilities as well as a sophisticated visual system and brain have been selected for several adaptive behaviour: predation, communication and defensive behaviour-camouflage against their direct predators (fishes, marine mammals and birds) (Hanlon and Messenger 1988, 1996; Messenger, 2001; Packard, 1972; Packard and Hochberg, 1977). These patterns have been studied from early juveniles to adult (Denton and Land, 1971; Hanlon and Messenger, 1988, 1996; Hanlon et al., 2009; Mäthger and Denton, 2001; Masthay, 1997). At least from hatching, cephalopods are able to neurally change their colour pattern even with an immature brain (Dickel et al., 1997, 2000). This change of colour is 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 of: 1) pigmentary colours, due to chromatophores and 2) structural colours, due to iridophores and leucophores (Messenger, 1974, 1979, 2001). The patterning results from their equilibrated and selected vertical distribution in the skin, with different optical properties, via a complex combination of each optical response.

Chromatophores are neuromuscular organs, under the direct control of the brain. These organs are composed of a central elastic sacculus with pigment linked to muscle fibers and nerves. Colour pattern depends on the proportion of coloured chromatophores that are expanded (up to 300 μ m), on the quality of the light, on the reflection on iridophores and leucophores. In adult cephalopods, chromatophores of up to five colours are present in the skin at densities of up to 300 mm² (Packard and Sanders, 1969), enabling presentation of complex chromatic displays (Hanlon and Messenger, 1996).

Because of its role in selective process, study the developmental basis of the colour patterns is informative about the mechanisms that control the final pattern as a physiological entity and allows understanding how each component affects the pattern and how a coloured pattern is structured.

5-2 Chromatophores network setting up in sepia embryo.

As in other metazoans, the embryo of *S. officinalis* is uncoloured at the beginning of the organogenesis

(from stage 14, Lemaire, 1970). The pigmentation appears progressively as the embryo resembles an adult (Fig. 3A-E) but chromatophores are probably functional earlier than the “pigmentation stage” (probably as soon as stage 23). From Packard (1985), the chromatophore net occurs by temporal waves of colours, the darkest being the oldest. In sepia embryo, chromatophores are small and their density increases in all the body areas in the same time the animal grows until hatching (stage 30, Lemaire, 1970). They set up very rapidly all together; the waves of colour and the maturation of the pigments depending of the position of the chromatophore remain to be determined (pers. obs.). No gene specific of chromatophore organ has been yet characterized preventing the identification of chromatophore before the colour appears.

The search of regular pattern of chromatophores can be done using distance methods for point patterns. In this context, the K-function introduced by Ripley (1977) is particularly useful to compare observed patterns and random (homogeneous Poisson distribution) patterns. 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 embryos just before hatchling (stage 30), demonstrated that the chromatophore are not randomly distributed at small distances (Fig. 3F), suggesting the existence of repulsion between them during ontogenesis. No gene has been identified in cephalopods that could explain the strict distribution of chromatophores, but some genes have been identified in other groups to have a role in the cell-cell interactions during the development, to intervene in the lateral inhibition process and/or in the spatial arrangement along the body such as Notch/Delta (Artavanis-Tsakonas et al. 1999).

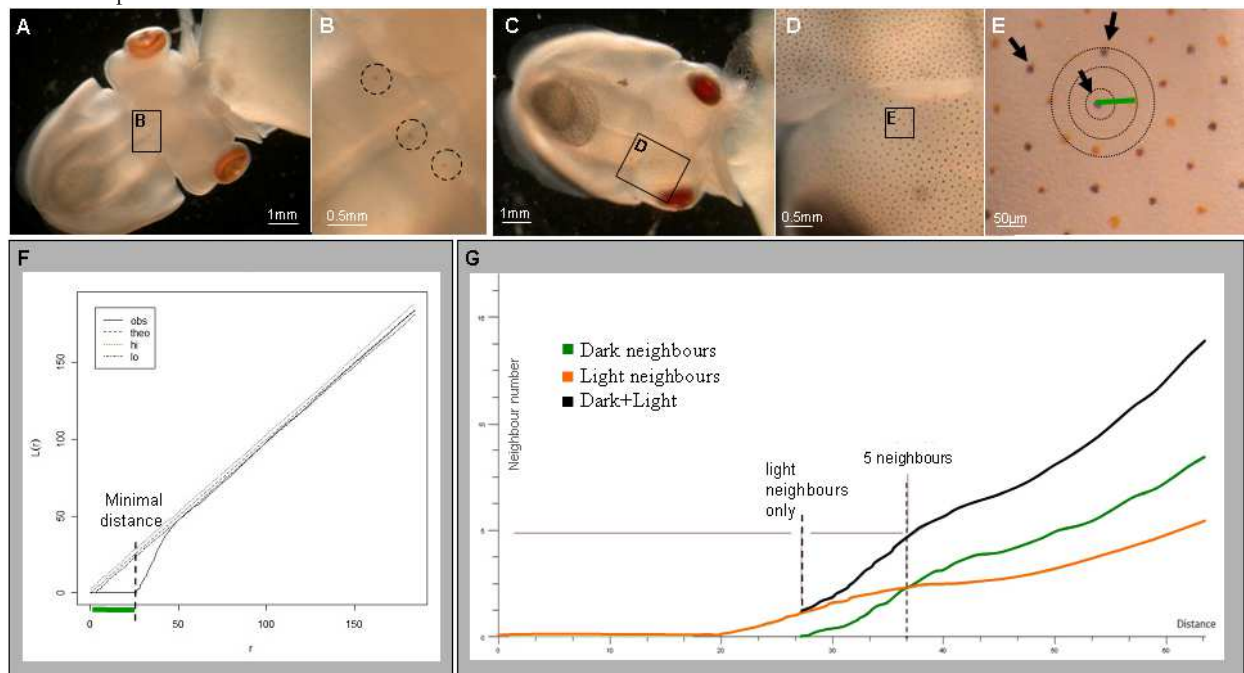
Moreover, plotting the number of neighbors of similar colour (“pale” or “dark”) of the chromatophore in function of the distance showed that the respective position of pale and dark chromatophores was not random. Their arrangement and their relative distance do not seem random (Fig.3G).

Interestingly, coloured patterns of gastropod shell have been related to a neurosecretory model (Boettiger et al., 2009). The model is built around the general property of local excitation coupled with lateral inhibition common to most neural networks. The authors apply their model to the dynamic patterning of cuttlefish skin and found that it can reproduce many patterns observed in the cuttlefish mantle. Because the mantle secretes the shell in all other molluscs, selection in cuttlefish of a sequential distribution of neuro-muscular organ and or sensorial cells associated, having the role of ancestral neurosecretory cells, cannot be excluded.

5-3 Chromatophore control system in the brain

Figure 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) colors. F- L function (black) of the distribution of dark chromatophores observed on the dorsal mantel of a

representative stage-30 embryo. The L function is defined here as $L = \sqrt{\frac{K(r)}{\pi}} - r$, where r is the distance. The images used were not calibrated, and r is expressed in arbitrary units. Upper (hi, green) and lower (lo, blue) envelopes of L functions of 20 random patterns (homogenous Poisson distribution) are also plotted. The L function of the chromatophore is clearly under the Poisson processes, indicating a “too regular” pattern and thus suggesting the existence of a repulsion between chromatophores during ontogenesis. With longer distances, the distribution becomes rapidly undistinguishable from a random distribution. G- the mean number of neighbors of a chromatophore and two classes (pale and dark chromatophores) were automatically detected. The first neighbors of a chromatophore are at a certain distance (not calibrated) and belong to the opposite class (green). Then chromatophores of the same class appear (black). The blue curve represents all the neighbors of a chromatophore.



Many studies investigating the organization of the adult cephalopod nervous system have proposed a main pathway involved in the control of body patterns which runs from the eye via the brain to the chromatophores (Boycott, 1961; Dubas et al., 1986; Young, 1971, 1974, 1976). Interestingly, 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 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 coloration patterning (Gaston and Tublitz, 2004; Loi et al., 1996; Loi and Tublitz, 1997, 2000; Tublitz et al., 2006) and a recent study has explored the involvement of these peptides during the development during the embryonic development of the cuttlefish. Aroua et al. (2011) have shown a precocious appearance and implementation of FaRPs neuronal networks during *S. officinalis* development.

Because of their distribution, FaRPs might act as neurotransmitters and/or neuromodulators. Moreover, they could exert specific ‘embryonic’ functions (as an involvement in neurogenesis) and/or could start their ‘adult’ one (as the control of chromatophores). This distribution also suggests the existence of a FaRPs pathway going from the optic lobe to the chromatophore muscles. Further molecular (as FaRPs receptor distribution) and/or physiological studies (as local inhibition) are necessary to clarify the functionality of this FaRPs pathway as well as the role of other neurotransmitter/neuromodulators.

The developmental relationships of all the structures implied, skin components, eye, brain in the behaviour involving camouflage and communication before hatching, through the envelopes and in juveniles in the cuttlefish remain to be explored in an integrative context and as a good example of an eco-evo-devo approach. The structure of cuttlefish eyes is strikingly similar, analogous to that of marine vertebrates with lens and retina. This is a classical example of convergence due to competition between

cephalopods and vertebrates as predators or prey (O'Dor and Webber, 1986; Packard, 1972). Though cephalopods are colour-blind, they may adapt their coloured body patterns by perceiving light properties by their retina, processed and integrated in the optic lobes (Gleadall and Shashar, 2004; Sutherland et al., 2008). Eye and skin functional abilities could have been concomitantly selected.

In addition; the dark colour of the egg envelopes, specific of *Sepia officinalis* probably protect embryo from light in the laying sites, the intertidal area. This could strongly play on the development to make properly the coloration pathways both in the skin and in the eyes. Actually, the skin is rich in opsin (Mäthger et al. 2010) that is stimulated by light radiation.

6-*Sepia officinalis*, a species in changing environment

By studying setting up of functions in ontogenesis, it is possible to follow as to how, with what rate, and in what sequence some particular functions have been developing, how they interact with each other in the process of development (Svidersky, 2000). This physiological approach of the eco-evo-devo field allows tracing (even though incompletely), in an ecological short term, the history of the appearance, formation, and development of functions. For an integrative view, the regulations of such physiological mechanisms are explored by including environmental cues. The evolutionary physiology approach is particularly useful in the context of changing environment, natural such as tides or provoked, accelerated by human in the context of global changes. As *Sepia* lay eggs near the coasts, they are submitted to physical and chemical variations i.e. temperature, light and salinity. This changing environment is a good natural experimental site to follow the influence, the impact and how some regulatory mechanisms have been selected during evolution and to predict sensitivity to future climate changes. The current and potential anthropogenic impacts on the early life stages, such as pollution and global changes (warming and acidification) are not well known.

Cephalopods encounter inside their eggs, in late stages of embryogenesis, abiotic conditions (low pH, high pCO₂) and it has been shown a higher sensitivity of squid vs. cuttlefish embryos to environmental acid-base disturbances (Hu et al., 2010). This could be related to a higher tolerance selected in cuttlefish that are submitted during development to higher variations in the intertidal area. Nevertheless, if the energy budget of adult cephalopods is not significantly compromised during long-term exposure to moderate environmental hypercapnia, cephalopod early life stages could be challenged by elevated seawater pCO₂ (Hu et al., 2011).

Still the function in the shell has been conserved in cephalopods despite shell

internalization, the calcification control remains to be solved in the cuttlefish, the only coleoid to have a mineralized shell. 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. The global changes could have severe consequences on mineralisation processes of aquatic organisms (Dupont et al., 2010; Gaylord et al., 2011). In the cuttlefish, the shell is used for buoyancy. Even if the adult bone is protected from environmental variations by the shell sac, it has been shown that modification of the pCO₂ (or pH) in waters led to abnormalities, disorders in the shell structure (Gutowska et al., 2010). These change the buoyancy abilities and could lead to disorder in the movement, locomotion and energy budget modifying the adult behaviour and disturbing the biological cycle. Even protected by envelopes, as the embryogenesis is a particularly sensitive stage, modification of the mineralisation processes in *Sepia officinalis* embryo must be considered.

Conclusion

Unconventional patterns by comparison with mollusc and vertebrates point out the differences in relationships between genes, i.e. the molecular pathways known in vertebrates in the setting up of the neuromuscular complex underscores the peculiarities of cephalopods and enlightens the biodiversity of the regulation pathways and the plasticity both of the cell and the genes. These bring new data on the adaptive evolution of some anatomical structural and physiological and biochemical pathways but the relationships between structure of genes and their function as well as the genes actually involved in the development remain largely unknown.

The comparison of genes should gain insights about the mechanisms of molecular evolution, duplication and subfunctionalisation processes. Unfortunately, molecular data available were until recently concentrated on vertebrates and ecdysozoans groups. Around 60% of animal species concerned by at least one achieved/on-going/funded genome sequencing projects belongs to Deuterostomia (5 % of the known Metazoa. Regarding molluscs (~10% of Metazoa), only 12 species are studied, and among them, 6 of the gastropod genus *Lottia*. This lack of genomic data does not facilitate the identification of homologous genes without close reference and carry out broad comparative genomics approaches. Moreover 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.

Genome sequencing on cephalopod that possesses the highest genome among molluscs happens crucial for comparative genomics in lophotrochozoan lineages. *Sepia officinalis* being an ideally suitable eco-evo-devo model and because the ESTs data are

increasing we propose its genome sequencing, the first one in cephalopod group.

Acknowledgments

Work from the authors was supported by an ANR (Agence Nationale de la Recherche) grant (number: JC/JC 0043-06). Research on *Sepia 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 chromatophores dynamic. The *Sepia* EST bank has been obtained in collaboration with Corinne Da Silva (CEA Genoscope).

References

- Akazawa, H., Komuro, I., 2005. Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases. *Pharmacol. Ther.* 107, 252-268.
- Antoshechkin, I., Sternberg, P.W., 2007. The versatile worm: genetic and genomic resources for *Caenorhabditis elegans* research. *Nat. Rev. Genet.* 8(7), 518-32.
- 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 (Jena)*, 114(2), 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. Statist.* 12 (6), 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.
- Bassaglia, Y., Beckel, T., Da Silva, C., Poulain, J., Andouche, A., Navet, S., Bonnaud, L. "Embryonic ESTs reveals tubulin and reflectin diversity in *Sepia officinalis* (Cephalopoda – Mollusca). submitted.
- Boettiger, A., Ermentrout, B., Oster, G., 2009. The neural origins of shell structure and pattern in aquatic mollusks. *Proc. Nat. Acad.Sci.* 106 (16), 6837-6842
- Boletzky, S.v., 2006. The *Sepia* egg: a showcase of cephalopod embryology. *Vie et Milieu.* 56, 191-201.
- 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.
- 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., 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., 1997. Cephalopoda. Microscopic anatomy of invertebrates 6A, Mollusca, part II. New-York: Wiley-Liss. (ed. W. Harrison and A. Kohn). pp 119-414.
- Budelman, B.U., Bonn, U., 1982. Histochemical evidence for catecholamines as neurotransmitters in the statocyst of *Octopus vulgaris*. *Cell Tissue Res.* 227(3), 475-83.
- 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.
- Capasso, A., Carginale, V., Madonna, L., Mancaniello, D., Scudieri, R., De Prisco, P.P., De Petrocellis, B., Parisi, E., 1991. A dopamine- and octopamine-sensitive adenylyl cyclase in the nervous system of *Octopus vulgaris*. *Comp. Biochem. Physiol. IOOB.* 805-803.
- Capasso, A., Carginale, V., Borrelli, L., Parisi, E., 1993. Receptor-mediated inhibition of octopamine-stimulated adenylyl cyclase in the optic lobe of *Octopus vulgaris*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C, 555-559.
- Chun, C.K., Scheetz, T.E., de 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.B., 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 settling 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 post-larval bivalve molluscs," *Biol. Bull.* 193, 116-124.
- Denton, E.J., Land, M.F., 1971. Mechanism of reflection in silvery layers of fish and cephalopods. *Proc. R. Soc. A* 178, 43-61.
- Dickel L., Chichery M-P., Chichery R., 1997. Postembryonic maturation of the vertical lobe complex and early development of predatory behaviour 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 the 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-Martínez, O., Thorndyke, M., 2010. Impact of near-future ocean acidification on echinoderms. *Ecotoxicology.* 19, 449-62.
- 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(3), 785-91.
- 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, 3089-98.
- 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, 2586-94.
- Gleadall, I.G., Shashar, N., 2004. The octopus' garden: the visual world of cephalopods. In: *Complex worlds from simpler nervous system*. MIT Press, Cambridge, MA (ed. F.R. Prete). 269-307
- 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. Harb. Symp. Quant. Biol.* 75, 1-9.
- Gutowska, M.A., Melzner, F., Langenbuch, M., Bock, C., Claireaux, G., Pörtner, H.O., 2010. Acid-base regulatory ability of the cephalopod (*Sepia officinalis*) in response to environmental hypercapnia. *J. Comp. Physiol. B.* 180(3), 323-35.
- 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. *Phil. Trans. R. Soc. London B.* 320, 437-487.
- Hanlon, R.T., Messenger, J.B., 1996. *Cephalopod Behaviour*. Cambridge University Press.
- Hanlon, R.T., Chiao, C.C., Mähger, L., Barbosa, A., Buresch, K.C., Chubb, C., 2009. Cephalopod dynamic camouflage: bridging the continuum between background matching and disruptive colouration. *Phil. Trans. R. Soc. 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(3), 211-29.
- 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(3), 571-583.
- Hu, M.Y., Tseng, Y.C., Stumpp, M., Gutowska, M.A., Kiko, R., Lucassen, M., Melzner, F., 2011. Elevated seawater PCO₂ differentially affects branchial acid-base transporters over the course of development in the cephalopod *Sepia officinalis*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300(5), R1100-14.
- Ingham, P.W., McMahon, A.P., 2001. Hedgehog signalling in animal development, paradigm and principles. *Genes Dev.* 15, 3059-3087.
- Jackson, D.J., Wörheide, 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. *Physiol.* 216, 213-226.
- 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. Lond.* 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., Thompson, J.T., 2003. Muscle arrangement, function and specialization in recent coleoids. *Berliner Palaobiol Abh* 3, 29-35.
- Kier, W.M., Schachat, F.H., 2008. Muscle specialization in the squid motor system. *J. Exp. Biol.* 211, 164-169.
- Kling, G., Schipp, R., 1987. Comparative ultrastructural and cytochemical analysis of the cephalopod systemic heart and its innervation. *Experientia* 43, 502-511.
- Kime, D.E., Messenger, J.B. 1990. Monoamines in the cephalopod CNS: an HPLC analysis. *Comp. Biochem. Physiol.* 96C, 49-57.
- 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: Extant cephalopods are younger than previously realised and were under major selection to become agile, shell-less predators. *Bioessays.* 33(8), 602-13.
- Lemaire, J., 1970. Table de développement embryonnaire de *Sepia Officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). *Bull. Soc. Zool. Fr.* 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., 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., 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.
- Lucero, M.T., Gilly, W.F., 1995. *Physiology of squid olfaction*. Cephalopod Neurobiology, Oxford:

- Oxford University Press (ed. N.J. Abbott, R. Williams and L. Maddock) 521-534.
- Millman, B., 1967. Mechanism of contraction in molluscan muscle. *Am. Zoologist* 7, 583-591.
- 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 D 1 receptors. *Neurobiology: Molluscan models*, Amsterdam: North Holland. (ed. H.H. Boer, W.P.M. Geraerts and J. Joose) 31-35.
- Masthay, M.B., 1997. Colour changes induced by pigment granule aggregation in chromatophores: a quantitative model based on Beer's law. *Photochem. Photobiol.* 66, 649-658.
- Mähger, L.M., Denton, E. J., 2001. Reflective properties of iridophores and fluorescent 'eyespots' in the loliginid squid *Alloteuthis subulata* and *Loligo vulgaris*. *J. Exp. Biol.* 204, 2103-2118.
- Mähger, L.M., Roberts, S.B., Hanlon, R.T., 2010. Evidence for distributed light sensing in the skin of cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Biol. Lett.* 6(5):600-3
- McCobb, D.P., Cohan, C.S., Connor, J.A., Kater, S.B., 1988a. Interactive effects of serotonin and acetylcholine on neurite elongation. *Neuron.* 1(5), 377-85.
- 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(1), 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. New Series* 3, 92-98.
- Messenger, J.B., 1996. Neurotransmitters of cephalopods. *Invert. Neurosci.* 2, 95-114.
- Messenger, J.B., 2001. Cephalopod chromatophores: neurobiology and natural history. *Biol. Rev.* 76, 473-528.
- Müller, G.B., 2007. Evo-devo: extending the evolutionary synthesis. *Nat. Rev. Genet.* 8, 943-949.
- Navet, S., Bassaglia, Y., Baratte, S., Martin, M. and Bonnaud, L. 2008. Somatic muscle development in *Sepia officinalis* (Cephalopoda-Mollusca): a new role for NK4. *Dev. Dyn.* 237(7), 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.
- Nederbragt, A.J., van Loon, A.E., Dictus, W., 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. *Developmental Biology*, 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(2), 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., Hochberg, F.G., 1977. Skin patterning in *Octopus* and other genera. *The biology of Cephalopods* Nixon & Messenger Eds. *Sym. Zool. Soc. London.* 38, 191-231.
- Packard, A., Sanders, G., 1969. What the octopus shows to the world. *Endeavour* 28, 92-99.
- Packard, A., 1985. Sizes and distribution of chromatophores during post-embryonic development in cephalopods. *Vie et Milieu* 35, 285-298.
- Page, D.T., 2002. Inductive patterning of the embryonic brain in *Drosophila*. *Development.* 129, 2121-2128.
- 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, 137-47.
- 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. Phys. [A]* 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., Cohan, C.S., 1991. A novel calmodulin antagonist, CGS 9343B, modulates calcium-dependent changes in neurite outgrowth and growth cone movements. *J. Neurosci.* 11(2), 534-42.
- Price, C.J., Goldberg, J.I., 1993. Serotonin activation of a cyclic AMP-dependent sodium current in an identified neuron from *Helisoma trivolvis*. *J. Neurosci.* 13(11), 4979-87.
- Read, R.D., 2011. *Drosophila melanogaster* as a model system for human brain cancers. *Glia.* 59(9), 1364-76.
- Ripley, B.D., 1977. Modelling spatial patterns (with discussion). *J. R. Stat. Soc., series B* 39, 172-212.
- Ruediger, T., Bolz, J., 2007. Neurotransmitters and the development of neuronal circuits. *Adv. Exp. Med. Biol.* 621, 104-15.
- Schipp, R., Schäfer, A., 1969. Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen an den zentralen Herzorganen von Cephalopoden (*Sepia officinalis*). Die Feinstruktur des Herzens. (Comparative electron microscopic studies of the central cardiac organs of cephalopods (*Sepia officinalis*). Ultrastructure of the heart. *Z. Zellforsch* 98, 576-598.
- Silver, S.C., Patterson, J.A., Mobbs, P.G., 1983. Biogenic amines in cephalopod retina. *Brain Res.* 273, 366-368.
- 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(1), 107-19.
- 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.
- Sutherland, R.L., Mäthger, L.M., Hanlon, R.T., Urbas, A.M., Stone, M.O. 2008. Cephalopod colouration model. I. Squid chromatophores and iridophores. *J. Opt. Soc. Am. A.* 25, 588-599.
- Svidersky, V.L., 2000. Tasks and Perspectives of Development of Evolutionary Physiology. *J. Evol. Biochem. Phys.* 36(3), 223-234. Translated from *Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii.* 36(3), 169-177.
- Tapscott, S.J., 2005. The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *Development* 132, 2685-2695.
- Tasaki, K., Suzuki, H., 1980. Efferent inhibitory system in the octopus retina. *Neurosci. Lett., Suppl.* 4, 563.
- Tauber A.I., 2010. Reframing developmental biology and building evolutionary theory's new synthesis. *Perspect. Biol. Med.* 53(2), 257-70.
- Tobia, C., De Sena, G., Presta, M., 2011. Zebrafish embryo, a tool to study tumor angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 55(4-5), 505-9.
- 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.
- Villanueva, R., Norman, M.D., 2008. Biology of the planktonic stages of benthic octopuses *Oceanogr. Mar. Biol.* 46, 105-202.
- Williamson, R., 1989. Electrophysiological evidence for cholinergic and catecholaminergic efferent transmitters in the statocyst *Octopus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 93C, 23-27.
- 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(1), 180.
- Young, J.Z., 1971. The anatomy of the nervous system of *Octopus vulgaris*, Oxford University Press.
- Young, J.Z., 1974. The central nervous system of *Loligo*. I. The optic lobe. *Phil. Trans. R. Soc. London B* 267, 263-302.
- Young, J.Z., 1976. The nervous system of *Loligo*. II. Suboesophageal centres. *Phil. Trans. R. Soc. London B* 274, 101-167.

ARTICLE 5

Navet, S., Baratte, S., Bassaglia, Y., Andouche, A., **Buresi, A.** Bonnaud, L. Neurogenesis in cephalopods: Eco-Evo-Devo approach in the cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca Cephalopoda). Review. Journal of Marine Science and Technology. (in press).

NEUROGENESIS IN CEPHALOPODS: « ECO-EVO-DEVO » APPROACH IN THE CUTTLEFISH *SEPIA OFFICINALIS* (MOLLUSCA-CEPHALOPODA)

Sandra Navet¹, Sébastien Baratte^{2,3}, Yann Bassaglia^{2,4}, Aude Andouche², Auxane Buresi² and Laure Bonnaud^{1,2}

¹Univ. Paris Diderot-Sorbonne Paris Cité

²Muséum National d'Histoire Naturelle. UMR BOREA MNHN CNRS 7208 IRD 207 UPMC
55 rue Buffon. 75005 Paris, France

³Univ. Paris Sorbonne-Sorbonne Universités

⁴Univ. Paris Est Créteil-Université Paris Est

Author for correspondence: Laure Bonnaud (e-mail: bonnaud@mnhn.fr)

ABSTRACT

Cephalopods are new evolutionary and ecological models. By their phylogenetic position (Lophotrochozoa, Mollusca), they provide a missing master piece in the whole puzzle of neurodevelopment studies. Their derived and specific nervous system but also their convergence with vertebrates offer abundant materials to question in a new light the evolution and development of the nervous system of Metazoa (evo-devo studies). In addition, their various adaptations to different modes of life open fields of investigation for developmental plasticity according to ecological context (eco-evo-devo approach). In this paper, we propose a review of the recent works on cephalopod nervous developmental investigations. We show how cephalopods, and especially *Sepia officinalis*, an animal of economical interest, can be used as suitable models to extend our knowledge on cephalopod ecology and on nervous system evolution among molluscs.

Keywords : Nervous system, Cephalopods, Development, Evolution

I. INTRODUCTION

Evolution of the nervous system is one of the key features of functional adaptation of metazoans to their environment: peripheral and central nervous systems associated to sensorial structures constitute the network of perception and integration of internal and environmental factors. These complex interactions and relationships between the nervous elements result from developmental processes and have been selected during evolution as they confer an adaptive advantage. In the general concern of Evo-Devo investigations, the ecological dimension of the development is essential in the light of new knowledge on genome plasticity [54]. Actually, since development is also influenced by non-genetic parameters, as environmental variations or epigenetic processes, the functional and adaptive context of organisms to their environment has to be integrated into a new field for study evolution of metazoans, called Eco-Evo-Devo.

Nervous system (NS) organisation of numerous metazoans is well known but efforts on development are restricted to chordates and ecdysozoans: Mouse, *Drosophila*, *Caenorhabditis* being the most extensively explored evo-devo models [2]. To elaborate hypotheses on evolution of structures and functions, additional models belonging to Lophotrochozoa are essential as they display a diversity of anatomical structures and physiological characteristics. Among them, in molluscs, cephalopods beyond their economic interest, constitute new biological models in an evolutionary

and comparative perspective for several reasons. First, few lophotrochozoans possess as many anatomical convergent structures with vertebrates such as the brain and the camerular eyes and their highly developed nervous system is used as physiological comparative model for vertebrates (Fig.1A). Second, cephalopods exhibit specific derived characters (synapomorphies) among molluscs that are worth being better explored: a very muscular mantle, arms and funnel derived from the foot, and cerebralisation of the central nervous system (Fig.1A) [8]. Their development is also particular: unlike other lophotrochozoans, they all present a discoidal cleavage and their development is direct. They do not show a veliger larva and no metamorphosis occurs apparently. The embryo develops inside a protective egg surrounded by black envelopes (Fig.1B, C). Third, beside these unique structures, the cephalopod taxa show a wide range of nervous system variations linked to their different mode of life (pelagic, necto-benthic and/or benthic).

In extant dominant group of cephalopods, coleoids (i.e. squids, cuttlefish and octopods), the external shell present in the ancestor, is internalized. The general tendency of shell reduction in cephalopod lineage reflects a trend towards active modes of life and much more complex behaviour [44]. The coleoids have other protective strategies, allowed by selection of particular and specific muscular structures and a performing nervous system, center of analysis. Depending on their pelagic (squids) or benthic life (cuttlefish and octopus), either a performing chromatophore system (camouflage), or

giant axons (for fast jet propulsion locomotion) or both were selected and used for escaping predators and to be themselves efficient predators (Fig.1A). Their diversity in morphology attests a high flexibility and adaptability and makes them a relevant biological material for evolutionary studies. Their development and the mechanisms that could have led to the evolutionary emergence of these derived traits begin to be studied at several hierarchical levels. More data on gene structure and function, molecular pathways, structure and organ development and anatomy, regulatory physiological system, should allow to get a better understanding of the evolutionary processes underlying neural system diversity in metazoans.

In this paper, we 1) describe the cephalopod nervous system and link it in a ecological and evolutionary context, 2) explain why *Sepia officinalis* is a suitable model for the NS development exploration (evo-devo), 3) summarize the molecular data available on the NS development and show the specificity of this control by a comparative approach, 4) state the development of the embryo *Sepia officinalis* in regard to its environment (eco-evo-devo).

II. The cephalopod nervous system as a central character to study the evolution of Bilateralia

1. Structure and evolution of the nervous system

The NS of cephalopod is composed by 1) a peripheral nervous system (PNS) with stellate ganglia, nervous cords of the arms/tentacles and several sparse ganglia and 2) a central nervous system (CNS) with a brain enclosed in a cartilaginous capsule and optic lobes (Fig.1A). PNS constitutes 2/3 of the nervous cells of the total nervous system. The stellate ganglia, specific of cephalopods, are crucial for the neuro-muscular laterality: they are the relay for the giant fibers innervating locomotory muscles and the chromatophores nerves pass through them (Fig.1A) [95].

The anatomical structures of adult CNS have been described in numerous cephalopods (*Octopus vulgaris* [86]; *Loligo vulgaris* [52, 96, 97, 98, 99], *Sepia officinalis* [12], *Idiosepius paradoxus* [80]). The brains of coleoids comprise the supra- and sub-oesophageal masses (SPM and SBM, Fig.1C right) disposed between the eyes around the oesophagus. They have clear internal and external features allowing the division into 25 major lobes, some of which are further subdivisions have been recognized, making nearly 40 lobes altogether [13, 78]. Different functions can be attributed to each lobe largely as a result of experiments carried out on *Octopus*, *Sepia* and *Loligo* [98].

Cephalopod nervous system has been extensively studied as a comparative model to vertebrates [94, 96, 97, 52, 37, 86]. It represents an important material for neurocytology, electrophysiology and biophysics, the most known being the giant axons of the squid [33, 38, 74]. Learning and memory capabilities are well developed

in cephalopods and many works have explored their performance and vertebrate-like behaviour [34, 37, 76, 99, 100]. With regard to anatomical structure comparisons, the convergence status of centralized nervous system between vertebrate and cephalopod is obvious [75]. This convergence allows access to differences or similarities which appeared during evolution in the development of structures with functional equivalence (i.e. analogy).

But how such a “supra-organized” nervous system appeared in cephalopods? The molluscan nervous system shows an extreme diversity and the evolutionary relationships concerning its orientation and polarization in the molluscan body plan are not yet clarified. The cephalopod nervous system is certainly the most sophisticated within Mollusca [14]. Nevertheless, it still shows a molluscan basic design (bauplan), as in gastropods (Fig. 2A) with a set of paired ganglia: the cerebral, pedal and visceral-pleural ganglia. The left and right of each pair are linked by a commissure whereas connectives run in anterior/posterior direction between the ganglia on one side. In cephalopods, this basic design has been modified in various ways. The ganglia are grouped and the CNS is cerebralized (Fig.1C). Their brain is far larger than that of other molluscs approaching that of vertebrates-fish [63]. The brain is arranged around the oesophagus in two main masses, each composed of several lobes (Fig. 2A).

2. Nervous system organisation and mode of life

The structure of the brain and the proportion of the lobes differ between cephalopod taxa [48]. The greatest centralization (cerebralization) among cephalopods is found in octopods [60]. Some conclusions can be drawn in adult about the significance of the patterns of connectivity between organization of the brain and habitat [19, 85, 98]. The relative size of the brain lobes change after hatching with morphological developments, those in some lobes being quite marked [31, 87]. Several of the changes have been correlated with changes in behaviour, habitat and habits in both *S. officinalis* and *Octopus vulgaris* [59]. In *Sepia* juveniles, memorization abilities increase during post-hatching development [26, 27, 51]. The mode of life differences between hatchling/adult individuals was accompanied in evolution by deep modifications. The maturation of the nervous system pre- and post-hatching can be interpreted as an adaptive response to environment of the juvenile and concerns both the CNS and the neuromuscular complex involved in the locomotion and patterning functions. For instance, the camouflage, one of the systems to escape predators, results from complex interactions of elements located in the skin. Chromatophores constitute the main component for the establishment of the patterns. They are neuromuscular organs and are under the direct control of the brain. The control is clearly bilateral (review in [53]). The lobes identified as controlling the chromatophores (chromatophore lobes, anterior and posterior) are located in the sub-

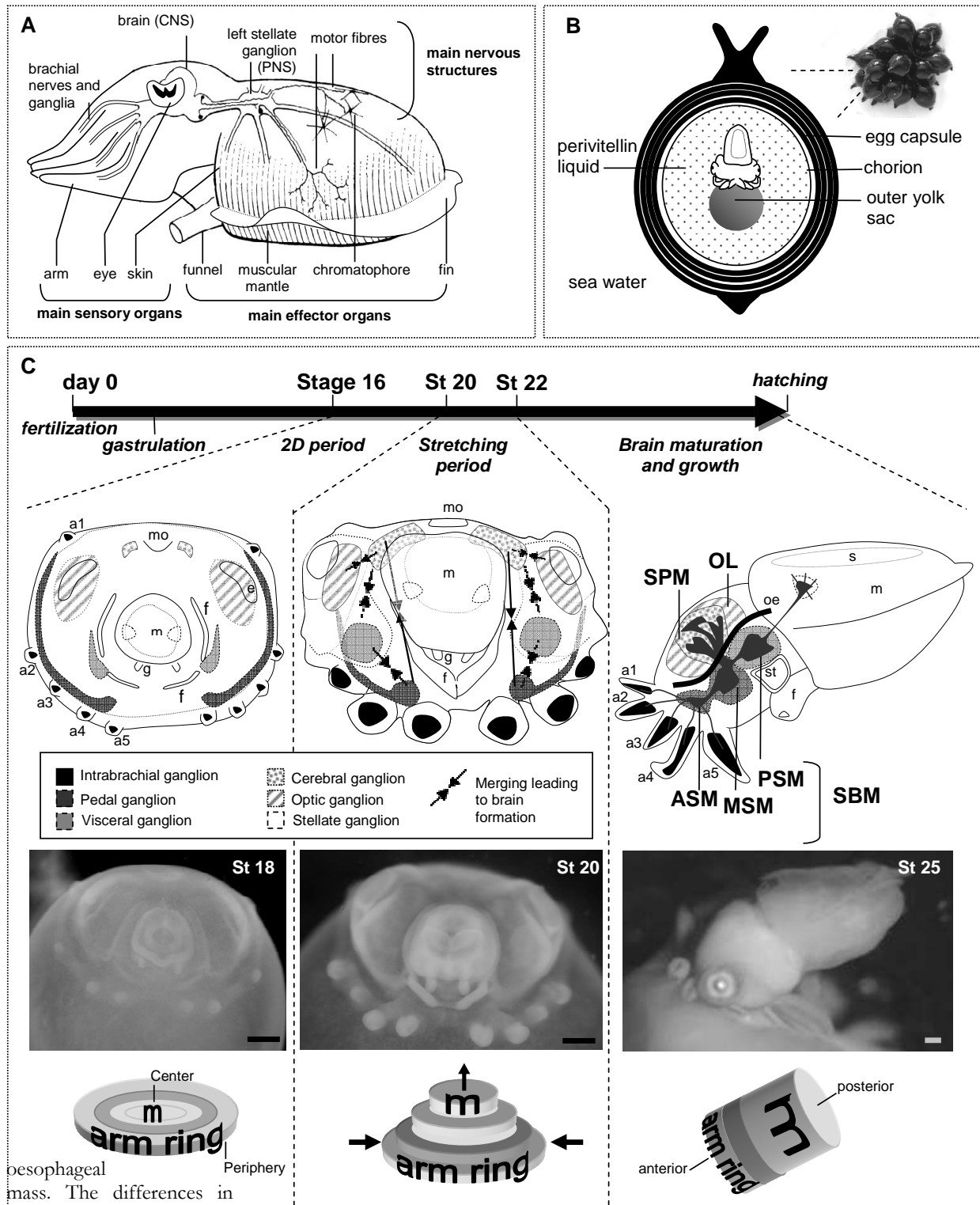


Figure 1. Main features of *Sepia officinalis* anatomy and development. A- Picture of a *Sepia officinalis* adult illustrating the main structures and organs involved in the interaction of the organism with its environment. B- Egg elements surrounding the *Sepia* embryo during its direct development. C- Main steps of *Sepia officinalis* development. Top: sketches of *Sepia* embryos during the three main periods of organogenesis with an emphasis on the development of the nervous structures (ganglia and brain lobes). Center: pictures of *Sepia* embryos at stages 18, 20 and 25 (stages from Lemaire, [47]). Bottom: illustration of the “Chinese lantern”-like development of *Sepia officinalis*, allowing the transition from a disk-shaped embryo to an adult-shaped embryo. Peripheral structures of the disk-shaped embryo, like arm buds, become anterior organs (from an ecological point of view) and central structures, like the mantle, become posterior organs. a1, a2, a3, a4, a5: arms 1, 2, 3, 4 and 5; ASM: anterior subesophageal mass; CNS: central nervous system; e: eye; f: funnel; g: gill; m: mantle; mo: mouth; MSM: middle subesophageal mass; oe: oesophagus; OL: optic lobe; PSM: posterior subesophageal mass; PNS: peripheral nervous system; s: shell; SBM: subesophageal mass; SPM: supraesophageal mass; st: statocyst. Scale bar: 200 μ m.

colored pattern behaviour are associated with different habits [34]. Benthic species, *Octopus* and *Sepia* show a highly complex chromatophore network by comparison with pelagic species (*Loligo*). Interestingly, the setting up and organisation of anterior chromatophore lobe is more complex in *Sepia* and *Octopus* than in *Loligo* [48].

Differences observed in the organisation of the PNS and neuromuscular complex are linked to the mode of life and the performance in fast-jet propulsion, the second system to escape predators. The giant cells and fibers constitute a relay between brain and muscles and insure a simultaneous bilateral transmission inducing the muscular mantle contraction; the first order cells and fibers are located in the brain and connected to the second ones that reach the stellate ganglia and connect the third order cells. The fibers are partially or totally fused (giant axon of the squid) leading to a more or less efficient propulsion. Accordingly, this system has been described essentially in pelagic or necto-benthic species (*Loligo* and *Sepia*) [93, 98],

III. Development and neurogenesis in *Sepia officinalis*

The development of several cephalopods has been described precisely for the first time by Naef in early 20th century [55]. It was only recently that the development of cephalopods has been considered in

an evolutionary perspective [7, 8, 9, 10] . Among them, *S. officinalis*, has been considered as a putative model in the evo-devo field [3, 4, 5, 29, 35, 46, 56, 57, 89] because of 1) its necto-benthic mode of life both of juveniles and adults; 2) the extensive knowledge of adult and juvenile nervous system and behaviour; 3) the knowledge of its embryogenesis and the ease to observe the development *in-ovo*; 4) the facility to collect eggs and to keep individuals in laboratory-controlled conditions.

1. Embryogenesis in *Sepia officinalis*

In the evo-devo field, the developmental processes are informative on the evolution and adaptative changes. In molluscs, the veliger larva is free and spends time until metamorphosis in direct contact with the environment (Fig.2B). Among specificities, cephalopods show a direct development, the embryo being protected by envelopes. It is supposed that having a veliger larva is a synapomorphy of molluscs and that the development of cephalopods is a consequence of the loss of the veliger stage. The metamorphosis modifies considerably the orientation of the organism and in gastropods, a close group of cephalopods, torsion and spiralisation lead to deep modifications of the internal organization.

Sepia officinalis is the European cuttlefish and has a necto-benthic mode of life both near the

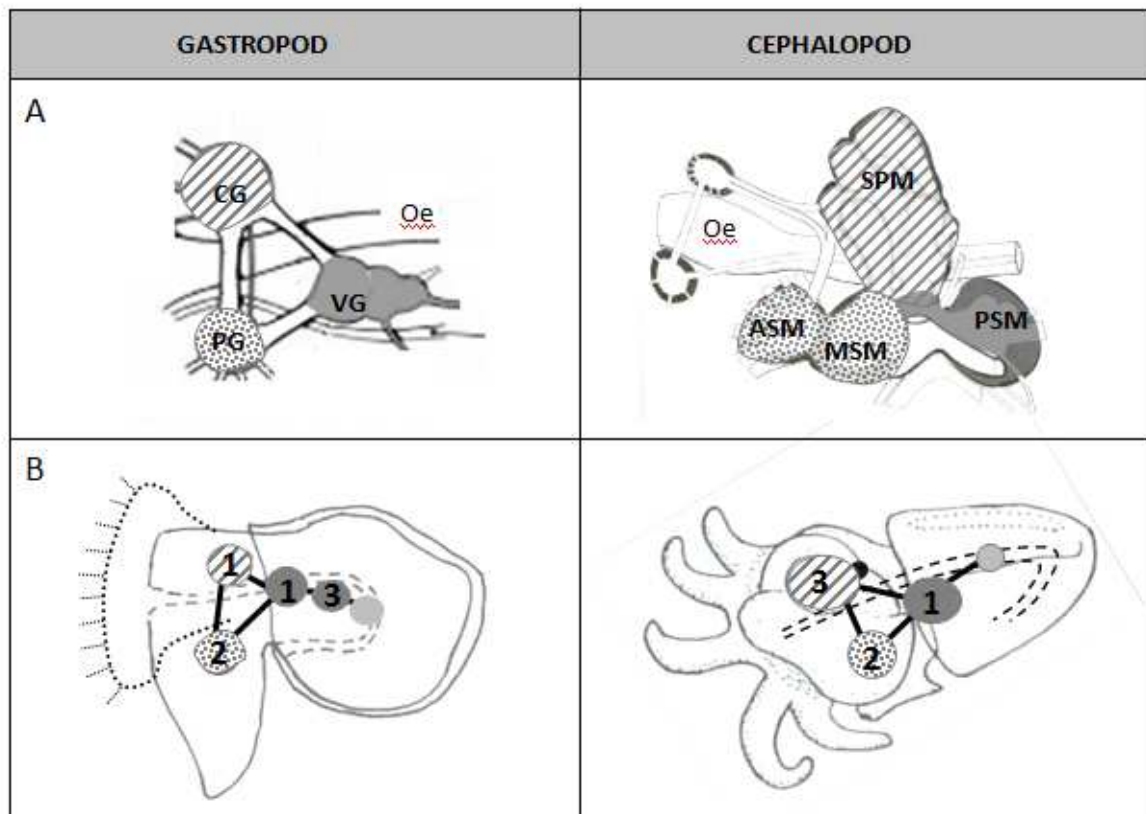


Figure 2. Comparison of the relative position of the ganglia brain between gastropod and cephalopod brain. A: brain in adult B: ganglia location in gastropod pretorsionnal veliger (left- from [36]) and in *S. officinalis* stage 24 embryo (right- [3, 15]) Numbers indicate the sequence of maturation for each ganglion. ASM: anterior subesophageal mass; CG: cerebral ganglion; MSM: middle subesophageal mass; oe: oesophagus; OL: optic lobe; PG: pedal ganglion. PSM: posterior subesophageal mass; SBM: subesophageal mass; SPM: supraesophageal mass; VG: visceral ganglion. 4

bottom and in midwater. Females generally mate and spawn in the intertidal zone [11, 73]. Eggs are attached in batches on hard substrata. Embryos are protected by an egg capsule composed of black envelopes (Fig.1B). The development is 2 months to 3 months long depending of the temperature of the waters. Eggs are telolecithal and present a meroblastic discoidal cleavage unlike other molluscs in which an holoblastic spiral segmentation occurs. The organogenesis started at a stage defined as the 14th (based on the Lemaire system, [47]) leading to a flat embryo (Fig.1C, left) above the yolk. Progressively, the embryo takes volume and straightens (Fig.1C, middle), until hatching at stage 30 (Fig. 1C, right). The newly hatched are identical to an adult and adopt the adult necto-benthic mode of life.

2. Neural network setting up in *Sepia officinalis*

Development of nervous system in cephalopods has been studied first in *Loligo vulgaris* [50] and *Octopus vulgaris* [49] based on histological works. Shigeno et al [78, 79] described the brain development of two other coleoids and Yamamoto et al [90] established the first atlas of neural structures development in *Idiosepius paradoxus*. These works have allowed to conclude to a global similarity in the development of the brains whereas the timing of the lobe formation and rearrangement is conditioned by the mode of life at hatching as already mentioned above.

At the beginning of organogenesis (disk-shaped embryo: stages 15 to 20), presumptive areas of the cerebroid ganglia emerge on both sides of the future mouth and then develop toward the eyes. The visceral ganglia start developing as two little territories on both sides of the mantle and the pedal ganglia emerge between arms 4 et 5 (Fig.1C, left). All these ganglia begin condensing and merging to each other from stage 23 to form the brain in the embryo's head (Fig.1C, middle). The brain is finally arranged around the oesophagus forming a supra and a sub-oesophageal mass (Fig. 1C, right). As for the peripheral nervous system, both stellate ganglia begin to develop on the left and right sides of the mantle at the edges of the presumptive shell sac [5] and intrabrachial ganglia take place all along the arms' crown and develop into the arms (Fig.1C).

All these studies are based on histological analysis and the comparison of nervous territories between gastropods and cephalopods is not facilitated by the fundamental differences in development (Fig.2B). How did the nervous system take place during evolution from a simple ventral nervous system with sparse ganglia is an unresolved question that can be only approached by the study of developmental genes. These data are necessary to the elaboration of phylogenetic hypotheses on the evolution of the NS within the mollusc lineage and to determine the origin of the specificities of the cephalopods nervous system. Moreover it will hopefully bring response elements to understand why

cephalopods exhibit so many nervous convergences with vertebrates, especially concerning cerebralisation.

IV- Molecular control of the nervous system development

The development of the nervous system is a very complex process, starting from the induction of the neural stem cells and lasting until the differentiation of neuronal progenitor cells into functional neurons correctly connected. In cephalopods, additional questions are particularly crucial: how do ganglia develop, how do they migrate and merge as lobes and how do brain lobes mature. Several aspects must be considered in the study of the molecular control of the development in an evolutionary perspective. 1) The characterization of homologous genes and comparison of their structure is informative about the molecular evolution and functional constraints; 2) the determination of their role (expression pattern/ protein production) in the setting up of homologous or convergent structures bring data on the processes of conservation, diversification and/or recruitment of genes (link structure/function/evolution); 3) the identification of the gene networks allows comparison of molecular pathways (how, who and when) and variations in the regulation processes, potentially responsible for nervous phenotypes diversity and adaptations.

1. Molecular data availability

Molecular data available for such evo-devo studies were until recently concentrated on vertebrates and ecdysozoans groups. Around 60% of animal species concerned by at least one achieved/on-going/funded genome sequencing projects belongs to Deuterostomia (5 % of the known Metazoa). Regarding molluscs (~10% of Metazoa), only 12 species are studied, and among them, 6 of the gastropod genus *Lottia*. This lack of genomic data does not facilitate the identification of homologous genes without close reference and carry out broad comparative genomics approaches. Moreover 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.

Nevertheless, for several years ESTs libraries of species of Lophotrochozoan are increasing: in molluscs even if often established from a specific organ or cell type of interest. In cephalopods, ESTs libraries have been elaborated from *Octopus eye* [62], *Euprymna scolopes light organ* [20], *Loligo bleekeri eye* [92], *Nautilus pompilius eye* [92]. The only ESTs library from organogenesis stages of a cephalopod embryo has been established for *Sepia officinalis* [6]. Thanks to these data, homologous genes, known in other metazoans to have a role in the nervous system development, have been tested in cephalopods. The necessity of cephalopod genome sequencing has been recently underlined [1].

2. Molecular control of neurogenesis in cephalopod

The first molecular work was the determination of the expression pattern of Hox gene family during the development of *Euprymna scolopes* [17, 46]. Hox genes generally show a collinear pattern of expression, in which anterior-class genes are expressed in more rostral domains than posterior-class genes. In this species, however, there are deep modifications in this colinearity correlated with the development of the morphological innovations of cephalopods and the modification in the orientation of the body plan during the direct development (Fig. 1C, bottom). Some Hox genes are expressed in nervous ganglia showing their role in the establishment of the central nervous system [39]: Lab and Hox3 in palliovisceral ganglia, Antp, Lox4 and Post2 in pedal ganglia [46].

Besides this study, transcription factors and morphogens have been explored during the development in several cephalopod species : *Euprymna scolopes* [29, 35], *Sepia officinalis* [4, 57], *Nautilus* [81], *Loligo opalescens* [82]. We summarize here some of our results obtained in *Sepia officinalis* embryos illustrating by a comparative approach the similarities and differences in the molecular control of neurogenesis in cephalopods.

engrailed

This transcription factor is a key gene in the establishment of segment polarity in almost all metazoans [30], in neurogenesis [67] and in appendage development [72]. Highly conserved in protostomes and deuterostomes, extensive comparisons among taxa suggest that neurogenesis is likely the ancestral function of engrailed and that subsequent recruitments have increased engrailed contributions [32, 67]. In molluscs, however, there is no strong data for the involvement of engrailed in neural development. By immunostaining, no engrailed protein has been evidenced in the developing nervous system in any stages of embryos of the three cephalopod species: *Sepia officinalis* (Fig.3A, [4]), *Nautilus pompilius* and *Idiosepius paradoxus* [81].

Pax6

Pax6 is a member of the paired-box family of transcription factors; it belongs to the *Pax* gene family [61]. In vertebrates and *Drosophila*, *Pax6* is expressed in the developing central nervous system and several optic structures [71, 84]. *Pax6* has also been characterized in annelids and molluscs including cephalopods (*Loligo opalescens* [82], *Euprymna scolopes* [35], *Sepia officinalis* [57]). In this group, *Pax6* is expressed in the eye, in the gills in sensorial structures such as the suckers of the arms but also in the cerebroid ganglia of the future CNS. Unlike vertebrates, *pax6* is probably involved in the setting up of the whole brain and its expression is not

restricted to a dorsal area (Fig. 3B). No expression is observed in peripheral ganglia.

shh

Shh belongs to the *hedgehog* family and is a diffusible morphogen [42]. In vertebrates and *Drosophila*, *Shh* is expressed in several regions of the brain [45, 65]. The data in the gastropod *Patella vulgata* show that *shh* is expressed in the ventral cord of the trochophore larvae and in sensorial cells [58]. On the contrary, in *S. officinalis*, expression pattern is very restricted and no staining is observed within the ganglia areas. *Shh* is expressed in tissues surrounding the whole optic area and around the arm buds (Fig.3C, [57]). In vertebrates, *Shh* has been shown to indirectly inhibit *Pax6*. This seems to be the case also in *Sepia officinalis* as these gene expressions do not overlap during *Sepia officinalis* development.

otx

Otx/orthodenticle like proteins are transcription factors known to have a very well conserved role in the development of photoreceptive organs and in the differentiation of anterior neural structures [39]. In *Sepia officinalis* embryos, *otx* expression is consistent with these functions, as staining can be found in the eyes from their early formation to hatching and in nervous ganglia destined to become anterior parts of the adult central nervous system (cerebral, optic and pedal ganglia, Fig.3D, [15]). Despite the fact that the central nervous system in *Sepia officinalis* arises from the aggregation of sparse ganglia and not from a unique central nervous tissue (as in vertebrates or insects), *otx* seems to have conserved its role for the anterior CNS determination.

Elav

elav/hu family members are among the earliest markers for neural cells as they just exit the cell cycle and start to differentiate into neurons. This function has been evidenced in the main metazoan groups [18, 25, 43, 66, 91]. In *S. officinalis*, two *elav/hu* homologs have been characterized, *Sof-elav1* being the most neural-specific paralog. *Sof-elav1* is expressed in all ganglia at one time of the development but its expression is not similar and not coordinated in all the prospective ganglia ([16]. In particular, both palliovisceral ganglia show an early and massive *Sof-elav1* expression (Fig.3E) whereas both cerebral ganglia are the latest ones that express *Sof-elav1* and exhibit differentiating neurons [16]. This result contrasts with what is found in other gastropods where cerebral and pedal ganglia are the first that differentiate neurons, just before the visceral ones (Fig. 2). Such an evolution of the differentiation timing may be one explanation of the exceptional development of the supra-oesophageal mass (issued from the cerebral ganglia) within the cephalopod brains.

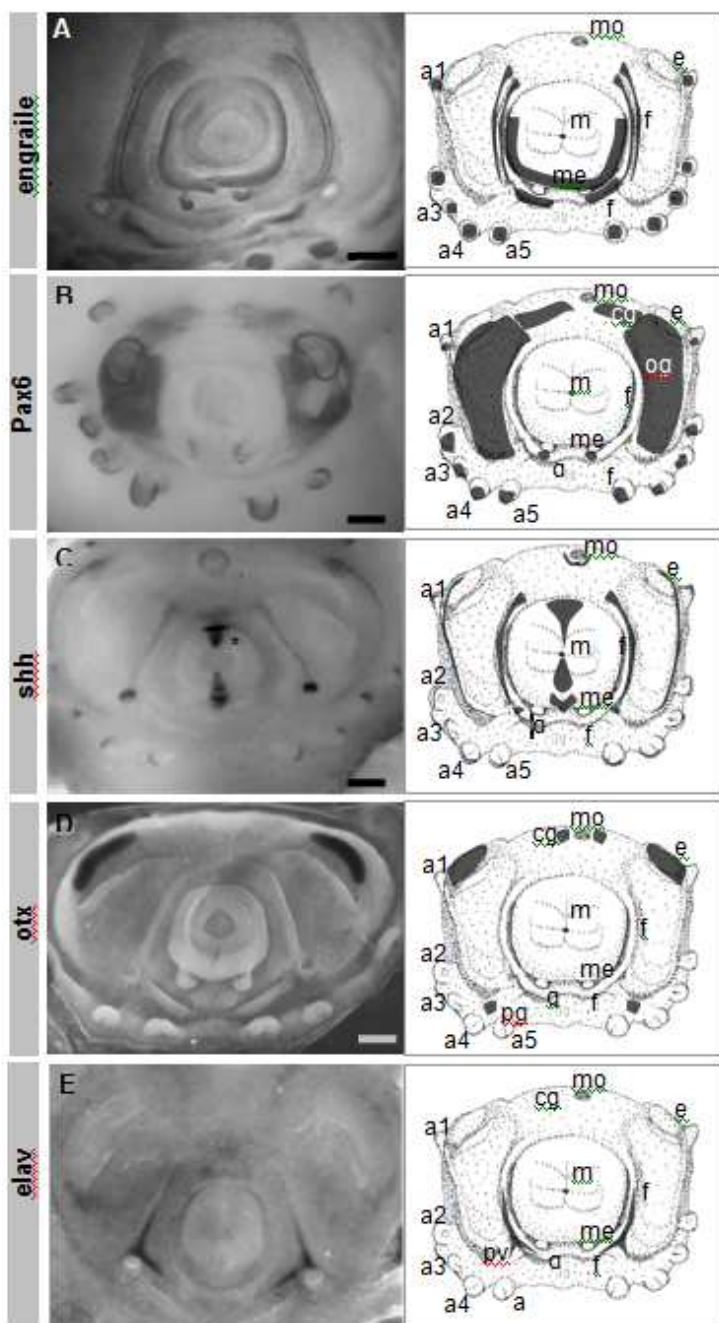


Figure 3. Expression and locations of some neurogenetic factors during *Sepia officinalis* embryogenesis (pictures on the left, drawings of stage 20 on the right). A- Engrailed immunostaining at stage 17 (from [4]). At this stage, Engrailed is mainly located in the arm buds (a1 to a5), in the funnel primordia (f) and at the mantle edge (me), which suggests a limited role of Engrailed in *Sepia* neurogenesis; B- *Pax6* *in situ* hybridization at stage 20 (from [57]). *Pax6* is expressed in the arm buds, the optic area and cerebral area, which suggests a role in the development of the brachial, optic (og) and cerebral (cg) ganglia; C- *Sbh* *in situ* hybridization at stage 20 (from [57]). *Sbh* is expressed in thin cell bands along the optic area, along the funnel area and in the arm buds. A median line of *sbh* expressing cells (asterisk) suggests a role of *sbh* in midline establishment in *Sepia*. D- *Otx* *in situ* hybridization at stage 17 (from [15]), showing expression in the eyes, in cerebral ganglia and pedal ganglia. E- *Elav* *in situ* hybridization at stage 17 (from [16]), showing an early expression in palliovisceral ganglia, a1, a2, a3, a4, a5: arms 1, 2, 3, 4 and 5, cg: cerebral ganglion, e: eye, f: funnel, g: gill, m: mantle, me: mantle edge, mo: mouth, og: optic ganglion, pg: pedal ganglion, pv: palliovisceral ganglion.

These results clearly illustrate the fact that the appearance of morphological innovations and/or derived characters, especially in the nervous system, is inseparable of potential modifications of the genes involved during their development, either by a modification of their role or by their expression pattern, although the gene structure is conserved. As a consequence, the gene relationships during the organogenesis are different from other metazoans showing the diversity of the regulation pathway and the plasticity of these developmental genes.

V-Physiological regulation and molecular control during embryogenesis

1. How to perceive environmental variations?

Because of the importance of environmental signals for normal biological cycle, the molecular regulation in response to variations during development could confer adaptive advantage that could be selected. The *Sepia* embryo is protected by envelopes and is bathed in a “buffered” environment (Fig.1B). All the structures (nervous and muscular) that allow perception, analysis and reaction to environment set up during development and permit an immediate functionality for benthic life at hatching.

By using antibody against TH, a key enzyme in the synthesis of dopamine, it has been shown that dopaminergic sensory neurons differentiate very early in the development before any ganglionic migration and brain formation (at around stage 20, [5]). These neurons exhibit dendrites and are probably already functional. An early differentiation of dopaminergic sensory neurons is frequent in veliger larvae and it has been suggested in some molluscs (gastropods and bivalves), that they are involved in metamorphosis induction [22, 23, 68, 69, 70], owing to their potential capacity to detect inductive chemical cues in the environment. Despite a direct development and a protection by envelopes, these data on *Sepia* embryo strongly suggest the occurrence of an early embryonic sensory nervous system, likely related to the perception of external cues. Interestingly, cerebral ganglia that contribute to the main parts of the brain learning and sensory centres, show a late extensive *Sof-elav1* expression [16]. These delayed expressions in ganglia suggest that most ganglionic cells postpone differentiation after hatching, in relation to the environmental stimuli. In other molluscs, where larval stage is free, the larval nervous system predates the development of the definitive adult nervous system, and cerebral ganglia are among the first to mature (Fig.2B). Some “noncephalopod” molluscs undergo their whole larval stage and metamorphosis inside an egg capsule and have been recently shown to respond to conspecific chemical stimuli by retarding their development (*Helisoma trivolvis*, *Lymnaea stagnalis* [83]).

2. Physiological regulation processes in a variable environment

Given that *Sepia officinalis* lay eggs near the coast, embryos are often exposed at low tide: the early sensory system of *Sepia officinalis* embryos may intervene to regulate development in response to dehydration, oxygenation, or osmoregulation stresses, this capacity being crucial to reach a final correct development. The protective envelopes limit the damage due to desiccation and can limit osmotic problems due to variation in salinity. As the embryo grows, the eggshell becomes thinner and permeable to seawater, which allows the supply of the various ions and respiratory gas required by the embryo [9, 88]. The influence of salinity stress on embryonic development and hatching success in cephalopods has been evidenced by numerous authors [21, 24, 28, 64, 77]. A recent study on two species of cephalopods (*Loligo vulgaris* and *Sepia officinalis*) has shown a role of gills and Na^+/K^+ -ATPase in the embryo before hatching showing the importance of osmoregulation process during the development. Differences have been evidenced between the two species studied probably in relation to their lifestyle [40]. The molecular mechanisms that are developed by the embryo to control the variations during the development remain to be determined in a comparative and evolutionary perspective.

In addition to the variations of salinity, modifications in temperature during the tide could affect the development. It is known that abnormal development occurs at high temperature [77]. This factor as well as the ocean acidification must be taken into account in the general context of global change. In a very nice work, Hu et al. [41] have explored the molecular control and the physiological regulation of the *Sepia* embryo after a long-term exposure to moderate environmental hypercapnia. They evidenced in late stage embryos a down-regulation of ion-regulatory and metabolic genes showing the sensitivity of the embryo to elevated seawater pCO_2 . This finding has important consequences on the ability of the cuttlefish to adapt to these changes and may affect durably the biological cycle of this species.

V. CONCLUSION

The *Sepia officinalis* species is a mollusc model allowing both developmental and physiological inferences in an evolutionary (and comparative) perspective and in the general context of the adaptation in aquatic environment. Recent global changes affect marine environment, such as global warming, increase of seawater pCO_2 , but also seawater pollution by heavy metal or pharmacological compounds. As environmental cues are essential to the setting up of the correct regulation of the neuro-endocrine factors during development, it can be predicted that global changes will measurably affect (or are already affecting) embryogenesis but also reproduction (especially gonadal maturation). Because

of their complex brain and of the convergences they shared with vertebrates, cephalopods stand therefore as essential and suitable models to investigate in a ecological context.

ACKNOWLEDGMENTS

Work from the authors was supported by an ANR (Agence Nationale de la Recherche) grant (number: JC/JC 0043-06) and a grant “Bourse de la Vocation Marcel Bleustein-Blanchet” Research on *Sepia 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).

REFERENCES

- 1 Albertin C.B., Bonnaud L., Brown T., Crookes-Goodson, W.J., da Fonseca, R.R., Di Cristo, C., Dilkes, B. P., Edsinger-Gonzales, E., Freeman, Jr., R. M., Hanlon, R., Koenig, K. M., Lindgren, A. R., Martindale, M. Q., Minx, P., Moroz, L. L., Nödl, M. T., Nyholm, S. V., Ogura, A., Pungor, J. R., Rosenthal, J. C., Schwarz, E. M., Shigeno, S., Strugnell, J. M., Wollesen, T., Zhang, G., Ragsdale C.W., “Cephalopod genomics: A plan of strategies and organization,” *Standards in Genomic Science*. Vol. 7, pp. 175-188. (2012).
- 2 Arendt, D. and Nübler-Jung, K., “Comparison of early nerve cord development in insects and vertebrates,” *Development*, Vol. 126, pp. 2309-2325 (1999).
- 3 Aroua, S., Andouche, A., Martin, M., Baratte, S. and Bonnaud, L., “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 (Jena)*, Vol. 114, No 2, pp. 113-122 (2011).
- 4 Baratte, S., Andouche, A. and Bonnaud, L., “Engrailed in cephalopods: a key gene related to the emergence of morphological novelties,” *Development Genes and Evolution*, Vol. 217, pp. 353-362 (2007).
- 5 Baratte, S. and Bonnaud, L., “Evidence of early nervous differentiation and early catecholaminergic sensory system during *Sepia officinalis* embryogenesis,” *Journal of Comparative Neurology*, Vol. 517, pp. 539-549 (2009).
- 6 Bassaglia, Y., Beckel, T., Da Silva, C., Poulain, J., Andouche, A., Navet, S. and Bonnaud, L., “Embryonic ESTs from embryonic stages reveals tubulin and reflectin diversity in *Sepia officinalis* (Cephalopoda – Mollusca),” *Gene*. 498 : 203–211 (2012)
- 7 Boletzky, S. v., “Cephalopod development and evolutionary concepts,” *Paleontology and neontology of cephalopods*, San Diego: Academic Press, inc. (ed. M. R. Clarke and E. R. Trueman), Vol. 12, pp. 185-202 (1988).
- 8 Boletzky, S. v., “Characteristics of Cephalopod embryogenesis,” *Cephalopods - Present and Past*, Stuttgart: Schweizerbart'sche

- Verlagsbuchhandlung (ed. J. Wiedmann and J. Kullmann), pp. 167-179 (1988).
- 9 Boletzky, S. v., "Development and reproduction in the evolutionary biology of cephalopoda," *Geobios M S*, Vol. 15, pp. 33-38 (1993).
 - 10 Boletzky, S. v., "The *Sepia* egg: a showcase of cephalopod embryology," *Vie et Milieu*, Vol. 56, pp. 191-201 (2006).
 - 11 Boucaud-Camou, E. and Boismery, J., "The migrations of the cuttlefish (*Sepia officinalis* L) in the English Channel," *The Cuttlefish, First International Symposium on the Cuttlefish Sepia*. Boucaud-Camou, E. (Ed.), Centre de Publications de l'Université de Caen, Caen, France, pp. 179-189 (1991).
 - 12 Boycott, B. B., "The functional organization of the brain of the cuttlefish *Sepia officinalis*," *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences*, Vol. 153, pp. 503-534 (1961).
 - 13 Budelmann, B. U., "Cephalopod sense organs, nerves and the brain: adaptations for high performance and life style," *Marine and Freshwater Behavioural Physiology*, Vol. 25, pp. 13-33 (1994).
 - 14 Budelmann, B. U., "The cephalopod nervous system: what evolution has made of the molluscan design," *The nervous system of invertebrates: an evolutionary and comparative approach*, Birkhauser Verlag, Basel (ed. O Breidbach and Kutsch), pp. 115-138 (1995).
 - 15 Buresi, A., Baratte, S., Da Silva, C. and Bonnaud, L., "*Otx* implication in anterior brain formation and in eyes development of *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda)," *Gene Expression Patterns*. 12(3-4): 109-116.
 - 16 Buresi, A., Canali, E., Bonnaud, L. and Baratte, S., "Delayed and asynchronous ganglionic maturation during cephalopod neurogenesis evidenced by *Sof-elav1* expression in embryos of *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda)," *Journal of Comparative Neurology*. 521(7): 1482-96 (2013).
 - 17 Callaerts, P., Lee, P. N., Hartmann, B., Farfan, C., Choy, D. W., Ikeo, K., Fischbach, K. F., Gehring, W. J. and de Couet, H. G., "HOX genes in the sepiolid squid *Euprymna scolopes*: implications for the evolution of complex body plans," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 99, pp. 2088-2093 (2002).
 - 18 Campos, A. R., Rosen, D. R., Robinow, S. N., and White, K., Molecular analysis of the locus *elav* in *Drosophila melanogaster*: a gene whose embryonic expression is neural specific. *EMBO Journal*, Vol. 6, pp. 425-431 (1987).
 - 19 Chrachi, A. and Williamson, R., "Modulation of spontaneous and evoked EPSCs and IPSCs in optic lobe neurons of cuttlefish *Sepia officinalis* by the neuropeptide FMRF-amide," *Journal of Neurosciences*, Vol. 17, pp. 526-536 (2003).
 - 20 Chun, C. K., Scheetz, T. E., de 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. and Soares. M. B., "An annotated cDNA library of juvenile *Euprymna scolopes* with and without colonization by the symbiont *Vibrio fischeri*." *BMC Genomics*, Vol. 7, pp. 154 (2006).
 - 21 Cinti, A., Barón, P. J. and Rivas, A. L., "The effects of environmental factors on the embryonic survival of the Patagonian Squid *Loligo gahi*," *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Vol. 313, pp. 225-240 (2004).
 - 22 Coon, S. L., Bonar, D. B. and Weiner, R. M., "Induction of settling and metamorphosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) by L-DOPA and catecholamines," *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, Vol. 94, pp. 211-221 (1985).
 - 23 Croll, R. P., Jackson, D. L. and Voronezhskaya, E. E., "Catecholamine-Containing cells in larval and post-larval bivalve molluscs," *Biological Bulletin*, Vol. 193, pp. 116-124 (1997).
 - 24 D'Aniello, A., D'Onofrio, G., Pischetola, M. and Denucci, J. M., "Effect of pH, salinity and Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺ and SO₄²⁺ ions on hatching and viability of *Loligo vulgaris* embryo," *Comparative Biochemistry and Physiology*, Vol. 94, pp. 477-481 (1989).
 - 25 Denes, A. S., Jékely, G., Steinmetz, P. R., Raible, F., Snyman, H., Prud'homme, B., Ferrier, D. E., Balavoine, G., and Arendt, D., Molecular architecture of annelid nerve cord supports common origin of nervous system centralization in bilateria. *Cell* Vol. 129, pp. 277-288 (2007).
 - 26 Dickel, L., Chichery, M.-P. and Chichery, R., "Postembryonic maturation of the vertical lobe complex and early development of predatory behavior in the cuttlefish (*Sepia officinalis*)," *Neurobiology of Learning and Memory*, Vol. 67, pp. 150-160 (1997).
 - 27 Dickel, L., Chichery, M. P. and Chichery, R., "Time differences in the emergence of short- and long-term memory during post-embryonic development in the cuttlefish, *Sepia*," *Behavioural Processes*, Vol. 44, pp. 81-86 (1998).
 - 28 Dupavillon, J. and Gillanders, B., "Impacts of seawater desalination on the giant Australian cuttlefish *Sepia apama*," *Marine Environmental Research*, Vol. 69, pp. 207-218 (2009).
 - 29 Farfán, C., Shigeno, S., Nödl, M. T. and de Couet H., G., "Developmental expression of *apterous/Lhx2/9* in the sepiolid squid *Euprymna scolopes* supports an ancestral role in neural development," *Evolution and Development*, Vol. 11, pp. 354-62 (2009).
 - 30 Fjose, A., McGinnis, W. J., and Gehring, W. J., "Isolation of a homeobox-containing gene from the engrailed region of *Drosophila* and the spatial distribution of its transcripts," *Nature*, Vol. 313,

- pp. 284-289 (1985).
- 31 Frösch, D., "Quantitative Untersuchungen am Zentralnervensystem der Schlüpfstadien von zehn mediterranen Cephalopodenarten," *Revue Suisse de Zoologie*, Vol. 78, pp. 1069-1122 (1971).
 - 32 Gibert, J.-M., "The evolution of *engrailed* genes after duplication and speciation events," *Development Genes and Evolution*, Vol. 212, pp. 307-318 (2002).
 - 33 Grant, P., Zheng, Y. and Pant, H. C., "Squid (*Loligo pealei*) giant fiber system: a model for studying neurodegeneration and dementia?," *Biological Bulletin*, Vol. 210, pp. 318-333 (2006).
 - 34 Hanlon, R. T., and Messenger, J. B., "Cephalopod Behaviour," Cambridge, U.K., Cambridge University Press (1996).
 - 35 Hartmann, B., Lee, P. N., Kang, Y. Y., Tomarev, S., de Couet, H. G. and Callaerts, P., "*Pax6* in the sepiolid squid *Euprymna scolopes*: evidence for a role in eye, sensory organ and brain development," *Mechanisms of Development*, Vol. 120, pp. 177-83 (2003).
 - 36 Hinman, V. F., O'Brien, E. K., Richards, G. S. and Degnan, B. M., Expression of anterior Hox genes during larval development of the gastropod *Haliothis asinina*. *Evolution and Development*, Vol. 5, pp. 508-21 (2003).
 - 37 Hochner, B., Shomrat, T. and Fiorito, G., "The octopus: a model for a comparative analysis of the evolution of learning and memory mechanisms," *Biological Bulletin*, Vol. 210, pp. 308-317 (2006).
 - 38 Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F., "Ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*," *Journal of Physiology*, Vol. 116, pp. 473-496 (1952).
 - 39 Holland, P. W. and Takahashi, T., "The evolution of homeobox genes: Implications for the study of brain development," *Brain Research Bulletin*, Vol. 66, pp. 484-90 (2005).
 - 40 Hu, M. Y., Sucre, E., Charmantier-Daures, M., Charmantier, G., Lucassen, M., Himmerkus and N., Melzner, F., "Localization of ion-regulatory epithelia in embryos and hatchlings of two cephalopods," *Cell and Tissue Research*, Vol. 339, pp. 571-583 (2010).
 - 41 Hu, M. Y., Tseng, Y. C., Stumpp, M., Gutowska, M. A., Kiko, R., Lucassen, M., Melzner, F., "Elevated seawater PCO₂ differentially affects branchial acid-base transporters over the course of development in the cephalopod *Sepia officinalis*," *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, Vol. 300, No 5, pp. 1100-1114 (2011).
 - 42 Ingham, P. W. and McMahon, A. P., "Hedgehog signalling in animal development, paradigm and principles," *Genes and Development*, Vol. 15, pp. 3059-3087 (2001).
 - 43 Kim, C.H., Ueshima, E., Muraoka, O., Tanaka, H., Yeo, S.Y., Huh, T.L., and Miki, N., Zebrafish *elav*/HuC homologue as a very early neuronal marker. *Neuroscience Letters*, Vol. 216, pp. 109-112 (1996).
 - 44 Kniprath, E., "Ontogeny of the molluscan shell field : a review," *Zoologica Scripta*, Vol. 10, pp. 61-79 (1981).
 - 45 Krauss, S., Concordet, J. P., Ingham, P. W., "A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos," *Cell*, Vol. 75, pp. 1431-1444 (1993).
 - 46 Lee, P. N., Callaerts, P., De Couet, H. G. and Martindale, M. Q., "Cephalopod Hox genes and the origin of morphological novelties," *Nature (London)*, Vol. 424, pp. 1061-1065 (2003).
 - 47 Lemaire, J., "Table de développement embryonnaire de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode)" *Bulletin de la Société Zoologique de France*, Vol. 95, pp. 773-782 (1970).
 - 48 Maddock, L. and J. Z. Young, "Quantitative differences among the brains of cephalopods," *Journal of Zoology (London)*, Vol. 212, pp. 739-767 (1987).
 - 49 Marquis, v. F., "Die embryonalentwicklung des Nervensystem von *Octopus vulgaris* Lam. (Cephalopoda, octopoda), eine histologische Analyse" *Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft in Basel*, Vol. 99, No 1, pp. 23-75 (1989).
 - 50 Meister, G., "Organogenese von *Loligo vulgaris* Lam.," *Zoologische Jahrbuch für Anatomie*, Vol. 89, pp. 247-300 (1972).
 - 51 Messenger J. B., "Learning performance and brain structure: a study in development," *Brain Research*, Vol. 58, pp. 519-523 (1973).
 - 52 Messenger, J. B., "The nervous system of *Loligo* IV. The peduncle and olfactory lobes," *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, Vol. 285, pp. 275-309 (1979).
 - 53 Messenger, J. B., "Cephalopod chromatophores: neurobiology and natural history," *Biological Reviews*, Vol. 76, pp. 473-528 (2001).
 - 54 Müller, G. B., "Evo-devo: extending the evolutionary synthesis," *Nature reviews genetics*, Vol. 8, pp. 943-949 (2007).
 - 55 Naef, A., "Die Cephalopoden. Embryologie, Fauna Flora Golf Neapel," Smithsonian Institution Press, Washington, Vol. 35, pp. 1-357 (1928).
 - 56 Navet, S., Bassaglia, Y., Baratte, S., Martin, M. and Bonnaud, L., "Somatic muscle development in *Sepia officinalis* (Cephalopoda - Mollusca): a new role for NK4," *Developmental Dynamics*, Vol. 237, pp. 1944-1951 (2008).
 - 57 Navet, S., Andouche, A., Baratte, S. and Bonnaud, L., "*Sbb* and *Pax6* have unconventional expression patterns in embryonic morphogenesis in *Sepia officinalis* (Cephalopoda)," *Gene Expression Patterns*, Vol. 9, pp. 9461-9467 (2009).
 - 58 Nederbragt, A. J., van Loon, A. E. and Dictus, W., "Expression of *Patella vulgata* orthologs of *engrailed* and *dpp*-BMP2/4 in adjacent domains

- during molluscan shell development suggests a conserved compartment boundary mechanism,” *Developmental Biology*, Vol. 246, pp. 341-355 (2002).
- 59 Nixon, M. and Mangold, K., “The early life of *Sepia officinalis*, and the contrast with that of *Octopus vulgaris* (Cephalopoda),” *Journal of Zoology London*, Vol. 245, pp. 407-421 (1998).
- 60 Nixon, M. and Young, J. Z., “The brain and lives of cephalopods,” Oxford University press, pp. 18-34 (2003).
- 61 Noll, M., “Evolution and role of Pax genes,” *Current Opinion in Genetics and Development*, Vol. 3, pp. 395-605 (1993).
- 62 Ogura, A., Ikeo, K. and Gojobori, T., “Comparative analysis of gene expression for convergent evolution of camera eye between octopus and human,” *Genome Research*, Vol. 14, pp. 1555-1561 (2004).
- 63 Packard, A., “Cephalopods and fish: the limits of convergence,” *Biological Reviews*, Vol. 47, pp. 241-307 (1972).
- 64 Paulij, W. P., Bogaards, R. H. and Denuce, J. M., “Influence of salinity on embryonic development and the distribution of *Sepia officinalis* in the Delta Area (South Western part of The Netherlands),” *Marine Biology*, Vol. 107, pp. 17-23 (1990).
- 65 Page, D. T., “Inductive patterning of the embryonic brain in *Drosophila*,” *Development*, Vol. 129, pp.2121-2128 (2002).
- 66 Park, H. C., Hong, S. K., Kim, H. S., Kim, S. H., Yoon, E. J., Kim, C. H., Miki, N., and Huh, T. L., Structural comparison of zebrafish Elav/Hu and their differential expressions during neurogenesis. *Neuroscience Letters*, Vol. 279, pp. 81-84 (2000).
- 67 Patel, N. H., Martin-Blanco, E., Coleman, K. G., Poole, S. J., Ellis, M. C., Kornberg, T. B. and Goodman, C. S., “Expression of engrailed proteins in Arthropods, Annelids and Chordates,” *Cell*, Vol. 58, pp. 955-968 (1989).
- 68 Pechenik, J. A., Li, W. and Cochrane, D. E., “Timing is everything: the effects of putative dopamine antagonists on metamorphosis vary with larval age and experimental duration in the prosobranch gastropod *Crepidula fornicata*,” *Biological Bulletin*, Vol. 202, pp. 137-47 (2002).
- 69 Pires, A., Coon, S. L. and Hadfield, M. G., “Catecholamines and dihydroxyphenylalanine in metamorphosing larvae of the nudibranch *Phestilla sibogae* Bergh (Gastropoda: Opisthobranchia),” *Journal of Comparative Physiology [A]*, Vol. 181, pp. 187-194 (1997).
- 70 Pires, A., Croll, R. P. and Hadfield, M. G., “Catecholamines modulate metamorphosis in the opisthobranch gastropod *Phestilla sibogae*,” *Biological Bulletin*, Vol. 198, pp. 319-331 (2000).
- 71 Quiring, R., Walidorf, U., Kloter, U. and Gehring, W. J., “Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans,” *Science*, Vol. 265, pp. 785-789 (1994).
- 72 Raftery, L. A., Sanicola, M., Blackman, R. K. and Gelbart, W. M., “The relationship of *decapentaplegic* and *engrailed* expression in *Drosophila* imaginal disks: do these genes mark the anterior-posterior compartment boundary?,” *Development*, Vol. 113, pp. 27-33 (1991).
- 73 Roper, C. F. E., Sweeney, M. J and Nauen, C. E., “Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries,” *FAO Fisheries Synopsis*, Vol. 125, pp. 1-277 (1984).
- 74 Rosenthal, J. J. and Gilly, W. F., “Identified ion channels in the squid nervous system,” *Neurosignals*, Vol. 12, No 3, pp. 126-141 (2003).
- 75 Sandeman, D., “Homology and convergence in vertebrate and invertebrate nervous systems,” *Naturwissenschaften*, Vol. 86, pp. 378-387 (1999).
- 76 Sanders, G. D., “The cephalopods” *Invertebrate Learning*, New York, Plenum Press (Corning WC, Dyal JA, Willows AOD eds), pp. 1–101 (1975).
- 77 Sen, H., “Temperature tolerance of Loliginid Squid (*Loligo vulgaris* Lamarck, 1798) eggs in Controlled Conditions,” *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Vol. 5, pp. 53-56 (2005).
- 78 Shigeno, S., Kidokoro, H., Goto, T., Tsuchiya, K. and Segawa, S., “Early Ontogeny of the Japanese Common Squid *Todarodes pacificus* (Cephalopoda, Ommastrephidae) with Special Reference to its Characteristic Morphology and Ecological Significance,” *Zoological Science*, Vol. 18, pp. 1011-1026 (2001).
- 79 Shigeno, S., Tsuchiya, K. and Segawa, S., “Embryonic and paralarval development of the central nervous system of the loliginid squid *Sepioteuthis lessoniana*,” *Journal of Comparative Neurology*, Vol. 437, pp. 449-475 (2001).
- 80 Shigeno, S. and Yamamoto, M., “Organization of the nervous system in the pygmy cuttlefish, *Idiosepius paradoxus* ortmann (Idiosepiidae, Cephalopoda),” *Journal of Morphology*, Vol. 254, pp. 65-80 (2002).
- 81 Shigeno, S., Sasaki, T., Moritaki, T., Kasugai, T., Vecchione, M. and Agata, K., “Evolution of the cephalopod head complex by assembly of multiple molluscan body parts: Evidence from *Nautilus* embryonic development,” *Journal of Morphology*, Vol. 269, pp. 1-17 (2008).
- 82 Tomarev, S. I., Callaerts, P., Kos, L., Zinovieva, R., Halder, G., Gehring, W. and Piatigorsky, J., “Squid *Pax-6* and eye development,” *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Vol. 94, pp. 2421-2426 (1997).
- 83 Voronezhskaya, E. E., Khabarova, M. Y. and Nezhlin, L. P., “Apical sensory neurons mediate developmental retardation induced by conspecific environmental stimuli in freshwater pulmonate snails,” *Development*, Vol. 131, pp. 3671-3680 (2004).
- 84 Walther, C. and Gruss, P., “*Pax-6*, a murine paired box gene, is expressed in the developing

- CNS,” *Development*, Vol. 113, pp. 1435–1449 (1991).
- 85 Williamson, R. and Chrachri, A., “Cephalopod neural networks,” *NeuroSignals*, Vol. 13, pp. 87-98 (2004).
- 86 Williamson, R. and Chrachri, A., “A model biological neural network: the cephalopod vestibular system,” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, Vol. 362, pp. 473-481 (2007).
- 87 Wirz, K., “Etude biométrique du système nerveux des Céphalopodes,” *Bulletin biologique de la France et de la Belgique*, Vol. 93, pp. 78-117 (1959).
- 88 Wolf, G., Verheyen, E., Vlaeminck, A., Lemaire, J. and Declair, W. “Respiration of *Sepia officinalis* during embryonic and early juvenile life,” *Marine Biology*, Vol. 90, pp. 35–39 (1985).
- 89 Wollesen, T., Cummins, S. F., Degnan, B. M. and Wanninger, A., “FMRamide gene and peptide expression during central nervous system development of the cephalopod mollusk, *Idiosepius notoides*,” *Evolution and Development*, Vol. 12, No. 2, pp. 113-130 (2010).
- 90 Yamamoto, M., Shimazaki, Y., and Shigeno, S., “Atlas of the embryonic brain in the pygmy squid, *Idiosepius paradoxus*,” *Zoological science*, Vol. 20, pp. 163-179 (2003).
- 91 Yim, S. J., Lee, Y. S., Lee, J. A., Chang, D. J., Han, J. H., Kim, H., Park, H., Jun, H., Kim, V. N., and Kaang, B. K., Regulation of ApC/EBP mRNA by the *Aplysia* AU-rich element-binding protein, ApELAV, and its effects on 5-hydroxytryptamine-induced long-term facilitation. *Journal of Neurochemistry*, Vol. 98, pp.420-429 (2006).
- 92 Yoshida, M. A. and Ogura, A., “Genetic mechanisms involved in the evolution of the cephalopod camera eye revealed by transcriptomic and developmental studies,” *BMC Evolutionary Biology*, Vol. 11, No 1, pp. 180 (2011).
- 93 Young, J. Z., “Structure of nerve fibres and synapses in some invertebrates,” *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. 4, pp. 1–6 (1936).
- 94 Young, J. Z., “The anatomy of the nervous system of *Octopus vulgaris*,” Clarendon Press, Oxford (1971).
- 95 Young, J. Z., “The organization of a cephalopod ganglion,” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, Vol. 263, pp. 409-429 (1972).
- 96 Young, J. Z., “The central nervous system of *Loligo*,” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, Vol. 276, pp. 351-398 (1974).
- 97 Young, J. Z., “The central nervous system of *Loligo*. II. The suboesophageal centres,” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological*, Vol. 274, pp. 101-167 (1976).
- 98 Young, J. Z., “Brain, behaviour and Evolution of cephalopods,” *Symposia of the zoological society, London*, No 38, pp. 377-434 (1977).
- 99 Young, J. Z., “The central nervous system of *Loligo*. V. The vertical lobe complex,” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, Vol. 286: pp. 311-354 (1979).
- 100 Young, J. Z., “Computation in the Learning System of Cephalopods,” *Biological Bulletin*, Vol. 180, pp. 200-208 (1991).

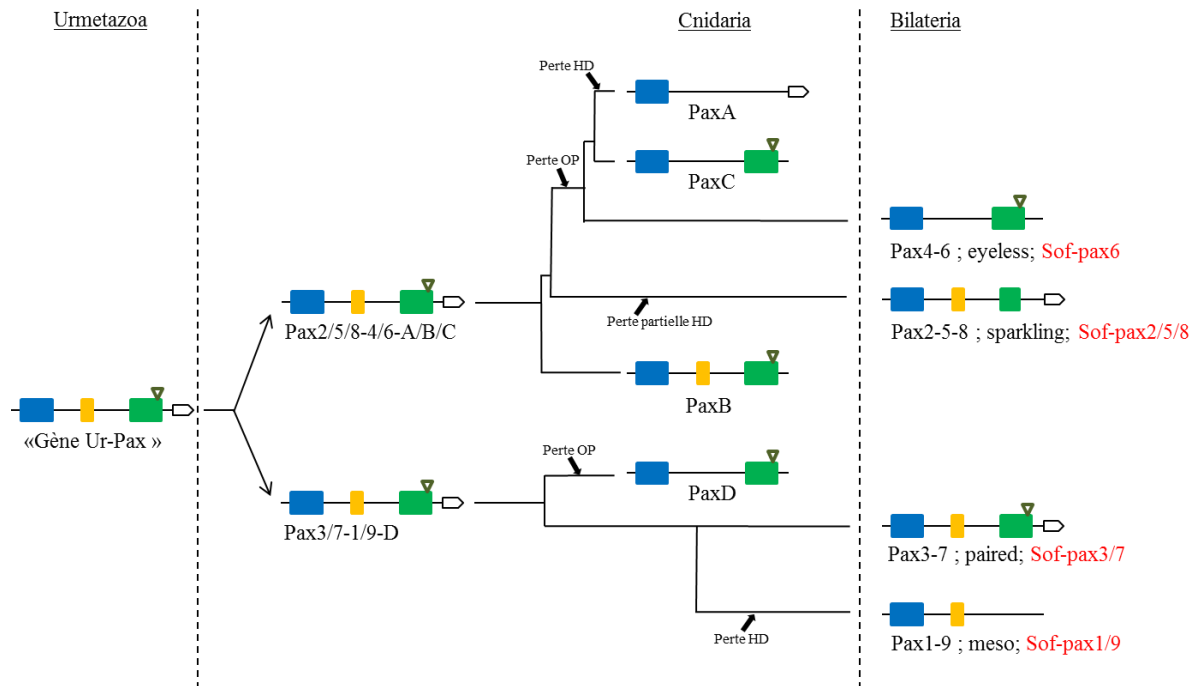
ANNEXES

Annexe 1

Les gènes de la famille *Pax* :

Les gènes *pax* codent des facteurs de transcriptions jouant des rôles clés dans le développement embryonnaire. En général, les protéines *Pax* présentent deux domaines de liaison à l'ADN, un domaine paired (PD), un homéodomaine (HD) et une courte séquence octapeptide située entre les domaines PD et HD (Vorobyov & Horst, 2006). On dénombre actuellement 4 groupes de gènes *pax* comportant un ou plusieurs paralogues selon les espèces. En fonction des conditions spatiotemporelles, chaque gène peut de plus générer des transcrits alternatifs avec des propriétés de liaison à l'ADN variables. Chez les vertébrés, 9 gènes *pax* se répartissent dans les 4 groupes, en fonction de leur homologie de séquence (Walther et al., 1991). Le groupe I comprend les gènes *pax1* et *pax9*. Leur séquence ne contient pas d'homéodomaine. Le groupe II comprend les gènes *pax2*, *pax5* et *pax8*. Les protéines comportent un PD, un octapeptide et un HD tronqué. Le groupe III comprend les gènes *pax3* et *pax7*, qui présentent les 3 domaines complets. Le groupe IV enfin comprend les gènes *pax4* et *pax6* qui comportent un domaine paired et un homéodomaine mais pas d'octapeptide.

Les études phylogénétiques récentes se basent sur l'analyse du domaine paired (Breitling & Gerber, 2000), présent chez tous les groupes de *pax*, et identifié pour la première fois au sein du gène *paired* de la drosophile (Frigerio et al., 1986). Le PD dériverait d'une transposase ancestrale, de type Tc1-transposase Mariner (Breitling & Gerber, 2000). L'homéodomaine, tronqué voir perdu dans certain gène *pax*, est un héritage génétique plus ancien que le domaine paired, et se retrouve dans des groupes aussi éloignés que les plantes et les opisthocontes, eumycètes compris (pour revue voir Gehring et al., 1994). L'HD retrouvé dans les protéines *Pax* se réfère cependant à un type précis de séquences, nommé «paired-type homeodomain (PtHD)» (Galliot et al., 1999). Tous les gènes *pax* découleraient d'un «*pax* ancestral», via des processus de duplication et de phénomènes de «captures» successives d'HD et d'OP au cours de l'évolution. Cependant, leurs interactions évolutives ainsi que leurs rôles ancestraux restent largement hypothétiques (Miller et al., 2000).



Un scénario possible de l'évolution des différents groupes de gènes *pax* chez les cnidaires et les bilatériens. Chez les Bilatériens, les homologues des chordés, suivit de ceux de *Drosophila* et enfin de *Sepia officinalis* (en rouge) sont spécifiés. Le gène « Ur-pax » comporte un HD (homéodomaine), un OP (octapeptide), un PD (domaine paired) et un P_tHD (paired tail homéodomaine) coté 3'. La première duplication, avant la divergence des Porifera, conduit à la formation de deux gènes ancestraux des groupes II, IV et III, I respectivement. De nouveaux phénomènes de duplication avec des changements notoires dans la PD, ainsi que des pertes totales ou partielles d'HD ou d'OP (flèches noires) font la spécificité des *pax*. En bleu : PD. En jaune : OP. En vert : HD. Un repère en triangle sur l'homéodomaine permet de visualiser si celui-ci est tronqué (ex. gènes *pax2-5-8/sparkling*). Sources : Hadrys et al., 2005 ; Vorobyov & Horst, 2006.

Annexe 2

Fragment du gène *Sof-pax6* : de 1 à 879 nt.

Accession >ADY0AAA33YN08CM1

Traduction: 293 a.a.

```
1 V S K I L G R Y Y E T G S I R P R A I G 20
1 gtttagcaagattctcggacggtactatgagacgggctccataaggccgcgcgatcggg 60

21 G S K P R V A T P E V V Q K I A Q F K R 40
61 ggcagcaagccaagagtggcgacccctgaagttgtgcagaaaatagccaattcaagagg 120

41 E C P S I F A W E I R D R L L S E G V C 60
121 gagtgcccctcgatattcgcacatgggaaattagggaccgattgctgtcagaaggagtttgc 180

61 T Q D N I P S V S S I N R V L R N L A G 80
181 acacaggataatataccaagtgtttcttcgataaacagggtgcttcgtaattctgcaggc 240

81 E N Q K V L G Q G T T M Y D K L G L L N 100
241 gaaaatcagaaggttcttgggtcaggggactacaatgtacgataaacttggcttctgaat 300

101 G Q A W P R P N P W Y A P N A S M A G L 120
301 ggtcaagcttggccacgcccacaaatccctggtaogcaactaatgocctocatggccggactg 360

121 S A P S S Y T Q P N P P S T V A G K K D 140
361 agcgctccctcaagctatacacaaccaaccaaccttccaccggttgctggtaaaaaagat 420

141 Q N V L S R T S A S L N G Q Q S W R L E 160
421 cagaatgttttgtccagaaccagtgocctcttgaatgggcagcagtcagggcgcttgagg 480

161 M E N L S A S S D N G Q G D G S Q N G E 180
481 atggagaatgttgagtgccagttcagacaacgggtcagggggatgggagccaaaatggtgaa 540

181 T D E Q M R I X L K R K L Q R N R T S F 200
541 acggacgaacaaatgcgatcangttgaaacggaaattgcagcggaatcgtaacatcatto 600

201 T A A Q I E A L E K E F E R T H Y P D V 220
601 actgcagcacagatagaagctttggaaaaagaatgtgaacgtactcattatccagacgtt 660

221 F A R E R L A Q K I D L P E A R I P G W 240
661 tttgcacgtgagaggttagctcagaaaatagacctgccagaagcccgtataaccgggggtg 720

241 F S N P R G K G P P E K N S L I K G G R 260
721 ttctccaatccaaggggaaaaggccccccagaaagaactccctaataaaggcgggagg 780

261 A P T V P P P S Q K T S S S I H G P T K 280
781 gccccaacggttccacccccctcccaaaaaacaagttcctccattcatggaccacaaaa 840

281 K P P G T M A I P K D L K 293
841 aaaccccccggcactatggcgatoccaaaggacactcaag 879
```

Domaine Paired

Homéodomaine

Amorce Forward: 5'ctccataaggccgcgcgatc 3' (SIRPRAI)

Amorce Reverse: 5'catggaggcattaggtgcgtaccag 3' (WYAPNASM) Amplification de 416 pb.

Annexe 3

Fragment du gène *Sof-pax3/7* : de 1 à 783 nt.

Accession >TC_01591

Traduction : 261 a.a.

```

1  M D Y Q Q R K E D N R S L I K G Q G R V 20
1  atggattaccaacaacgaaaggaggacaatcgttcgcttataaaaggccaggggaagagta 60

21  N Q L G G V F I N G R P L P N H V R L K 40
61  aaccaactgggaggggtatztatcaatggaaggccgctcccaaatcatgttcggcttaaa 120

41  I V E L A A Q G V R P C V I S R Q L R V 60
121  atcgttgaactggcagcgcaaggggttcgaccctgtgtgatcagccgccaactgcggtg 180

61  S H G C V S K I L Q R Y Q E T G S I R P 80
181  tctcacggatgcgtcagtaaaatcctccagcgcctaccaggaaaccggtagtatacggccg 240

81  G V I G G S K P R V A T P E V E K R I E 100
241  ggagtcatcgggggctcgaaaaccgcgcggttgctactcctgaggtcgagaagcggatcgag 300

101  Q Y K K D N P G I F S W E I R D K L L K 120
301  cagtacaagaaagataaaccagggtattttcagctgggagattcgcgacaagctgctgaaa 360

121  E G V C D R S T V P S V S S I S R V L R 140
361  gaaggcgtgtgcgaccgcagcacgggtgccagcgcagttccatcagtcggtgtgctcagg 420

141  S R F H S E D D D D D C D D D D D D E K 160
421  agccggtttcacagcgaagacgatgacgatgattgcgacgacgacgacgatgacgaaaaa 480

161  R I K M A R S E N G S D K N T N H S I D 180
481  cggatcaaaatggctcgcagtgagaacggaagcgacaaaaataccaaccacagcatcgac 540

181  G I L G E V K L H K S D K D D I S D A D 200
541  ggaattttaggagaggtcaaactgcacaaatccgacaaagatgatatctcagacgctgac 600

201  S E P G F Q V K R K Q R R S R T T F T A 220
601  tcggaaacgggatttcaagtcgaaacgcaagcagagacgcagtcgcacaacatttactgct 660

221  D Q L E E L E K A F E R T H Y P D I Y T 240
661  gatcaactggaagagttggagaaggcgttcgagcgcaccactaccagatatttatact 720

241  R E E L G Q R T K L T E A R V Q V W F S 260
721  cgcgaggagctgggcccagaggacaaaactgacagaagctcgcgtccaggtttggtttagt 780

261  N 261
781  aac 783

```

Domaine Paired

Octapeptide

Homéodomaine

Amorce Forward: 5' gtctcacggatgcgtcagta 3' (SHGCVS)

Amorce Reverse: 5' ttccgagtcagcgtctgaga 3' (ISDADSE)

Amplification de 427 pb.

Annexe 4

Fragment du gène *Sof-pax2/5/8* : de 1 à 846 nt.

Accession >TC_00826

Traduction : 282 a.a.

```

1  M D L T T A Y R Y H N T N L N M M D F Y 20
1  atggacctaaccacagcgtaccgttaccacaacactaatctaaatatgatggacttctat 60

21  H S C K M L N G S K H N E T F T G F Y E 40
61  cactcttgtaaaatgctcaatggctccaaacataatgaaacctttacaggattttatgaa 120

41  A T E G H G G V N Q L G G V F V N G R P 60
121  gcaacagaaggccacggcggagttaaccaactaggtggtgtgtttgttaacgggaggccc 180

61  L P D A V R Q R I V E L A H Q G V R P C 80
181  ttaccggagcgcagttcggcaacggattgtggaattggcccaccaaggggtccgaccatgt 240

81  D I S R Q L R V S H G C V S K I L G R Y 100
241  gatatctctcgacagttacgtgtctcccatgggtgcgtcagtaaaattctgggcaggtat 300

101  Y E T G S I K P G V I G G S K P K V A T 120
301  tatgaaactgggtctataaaaaccaggcgtaatcggcggttcgaagcccaaagtagccacc 360

121  P K V V E A I S K Y K Q E N P T M F A W 140
361  caaaagttgtagaggccatttcaaaatataagcaagaaaatccgaccatgtttgctgg 420

141  E I R D R L L S E N I C S Q D N V P S V 160
421  gagaatcgcgatcgtttattatcagagaatatctgcagccaagacaatgttccgagcgtc 480

161  S S I N R I V R N R A A E K A K A Q N P 180
481  agttctattaacagaatagtcgggaatcgagcccgagaaaaagccaagggtcaaaaccg 540

181  Q A Q S S P P L Q G E A P P P A L N Q T 200
541  caggcccagtcgagtcctccacttcaaggtgaggcccaccaccggctcttaaccagact 600

201  Q A P A G A D G M T R P G P Y S I S G I 220
601  caggctcctgctggggcagatggtatgacacgaccggacctattcaataagtggaatc 660

221  L G I P S Q N S A N L N N G S F K R K R 240
661  ttgggaatcccttctcaaaactcagcgaatgtgaataatggaagctttaaacggaaaaga 720

241  D D E S V Q N G H A D P E N R T D T Q N 260
721  gatgacgaatcgggtgcaaaatggccatgcagatccagaaaacagaacagacacgcaaaat 780

261  D Q M I Y P T E H T V I P P K V S R I D 280
781  gaccagatgatttatccaacagaacataccgtaattccacccaaggtttcacgtattgat 840

281  H N 282
841  cacaat 846

```

Domaine Paired

Octapeptide

Amorce Forward: 5' acctaaccacagcgtaccgt 3' (DLTTAYR)

Amorce Reverse: 5' gaccatgtttgctgggaga 3' (TMFAWE)

Amplification de 420 pb.

Annexe 5 A

```

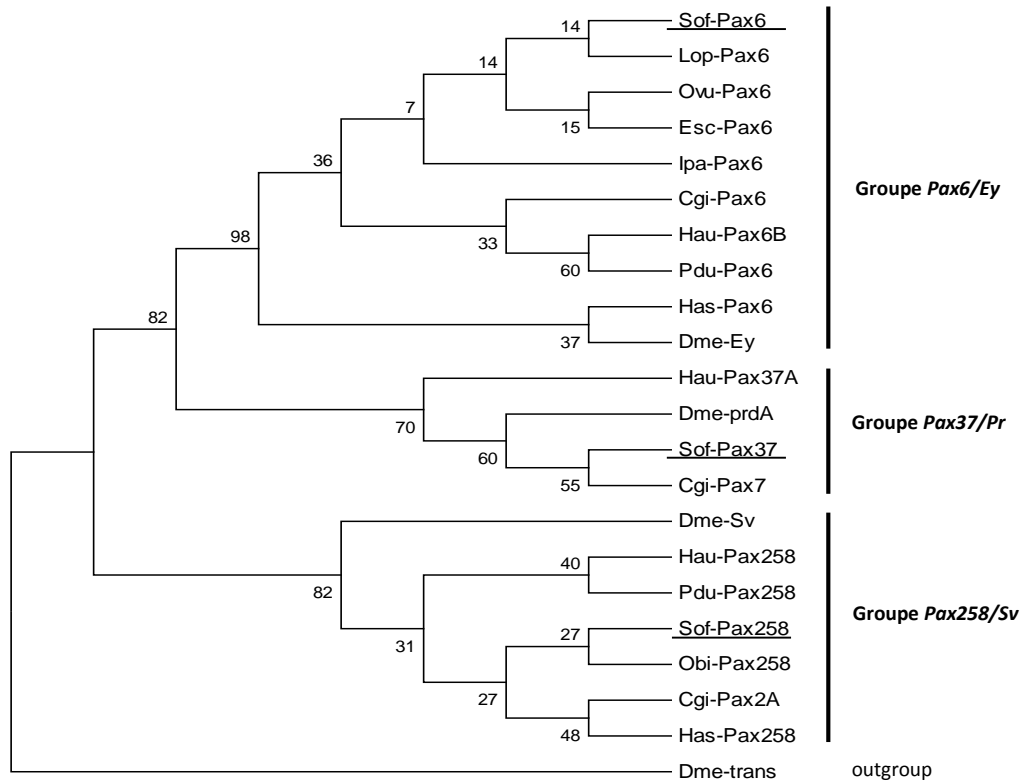
Sof-Pax6/1-78 -----VSK|LGRIYETGS|IR
Ipa-Pax6/1-127 GHSGVNQLGGVVFVNGRPLPDSTRQR|VELAHSGARPCD|SR|LQVSNGCVSK|LGRIYETGS|IR
Lop-Pax6/1-127 GHSGVNQLGGVVFVNGRPLPDSTRQR|VELAHSGARPCD|SR|LQVSNGCVSK|LGRIYETGS|IR
Ovu-Pax6/1-99 -----?GGVVFVNGRPLPDSTRQR|VELAHSGARPCD|SR|LQVSNGCVSK|LGRIYETGS|IR
Esc-Pax6/1-127 GHSGVNQLGGVVFVNGRPLPDSTRQR|VELAHSGARPCD|SR|LQVSNGCVSK|LGRIYETGS|IR
Cgi-Pax6/1-127 GHSGVNQLGGVVFVNGRPLPDSTRQR|VELAHSGARPCD|SR|LQVSNGCVSK|LGRIYETGS|IR
Has-Pax6/1-79 -----RPLPDSTRQR|VELAHSGARPCD|SR|LQVSNGCVSK|LGRIYETGS|IR
Hau-Pax6B/1-126 - ?SGVNQLGGVVFVNGRPLPDSTRQR|VELAHSGARPCD|SR|LQVSNGCVSK|LGRIYETGS|IR
Pdu-Pax6/1-127 GHSGVNQLGGVVFVNGRPLPDSTRQR|VELAHSGARPCD|SR|LQVSNGCVSK|LGRIYETGS|IR
Dme-Ey/1-127 CHSGVNQLGGVVFVNGRPLPDSTRQK|VELAHSGARPCD|SR|LQVSNGCVSK|LGRIYETGS|IR
Sof-Pax258/1-127 GHGGVNQLGGVVFVNGRPLPDAVRQR|VELAHQGVVPCD|SRQLRVSHGCVSK|LGRIYETGS|K
Hau-Pax258/1-126 - HGGVNQLGGVVFVNGRPLPDMVRQR|VELAHQGVVPCD|SRQLRVSHGCVSK|LGRIYETGS|K
Obi-Pax258/1-96 -----NQLGGVVFVNGRPLPDAVRQR|VELAHQGVVPCD|SRQLRVSHGCVSK|LGRIYETGS|K
Cgi-Pax2A/1-127 GHGGVNQLGGVVFVNGRPLPDVVRQR|VELAHQGVVPCD|SRQLRVSHGCVSK|LGRIYETGS|K
Has-Pax258/1-79 -----RPLPDVVRTR|VELAHQGVVPCD|SRQLRVSHGCVSK|LGRIYETGS|K
Pdu-Pax258/1-127 GHGGVNQLGGVVFVNGRPLPDVVRTR|VELAHQGVVPCD|SRQLRVSHGCVSK|LGRIYETGS|VR
Dme-Sv/1-126 - HGGVNQLGGVVFVNGRPLPDVVRQR|VELAHQGVVPCD|SRQLRVSHGCVSK|LGRYYETGS|FK
Sof-Pax37/1-127 GQGRVNQLGGVF|NGRPLPNHVR|LQ|VELAAQGVVPCV|SRQLRVSHGCVSK|LQRYQETGS|IR
Hau-Pax37A/1-126 GQGKVNQLGGVF|NGRPLPLNI|RLK|VEMASQGVVPCV|SRTLQVSHGCVSK|LQRYQETGS|IR
Cgi-Pax7/1-127 GQGRVNQLGGVF|NGRPLPNH|RLK|VELAAQGVVPCV|SRQLRVSHGCVSK|LQRYQETGS|IR
Dme-prdA/1-127 GQGRVNQLGGVF|NGRPLPNNI|RLK|VEMADG|IRPCV|SRQLRVSHGCVSK|LNRQYQETGS|IR

Sof-Pax6/1-78 PRA|GGSKPRVATPEVVQK|AQF|KRECPS|FAWE|RDRL|SEGVC|TQDN|PSVSS|NRVLRNL
Ipa-Pax6/1-127 PRA|GGSKPRVATPEVVQK|AQF|KRECPS|FAWE|GDRL|SEGVC|TQDN|PSVSS|NRVLRNL
Lop-Pax6/1-127 PRA|GGSKPRVATPEVVQK|AQF|KRECPS|FAWE|RDRL|SEGVC|TQDN|PSVSS|NRVLRNL
Ovu-Pax6/1-99 PRA|GGSKPRVATPEVVQK|AQF|KRECPS|FAWE|RDRL|SE-----
Esc-Pax6/1-127 PRA|GGSKPRVATPEVVQK|AQF|KRECPS|FAWE|RDRL|SEGVC|TQDN|PSVSS|NRVLRNL
Cgi-Pax6/1-127 PRA|GGSKPRVATPEVVQK|AQF|KRECPS|FAWE|RDRL|SEGVC|TQDN|PSVSS|NRVLRNL
Has-Pax6/1-79 PRA|GGSKPRVATPEVVQK|AQF|KRECPS|-----
Hau-Pax6B/1-126 PRA|GGSKPRVATPEVVQK|AQF|KRECPS|FAWE|RDRL|SECL|TQEN|PSVSS|NRVLRNL
Pdu-Pax6/1-127 PRA|GGSKPRVATPEVVQK|AQF|KRECPS|FAWE|RDRL|SEGVC|NQDD|PSVSS|NRVLRNL
Dme-Ey/1-127 PRA|GGSKPRVATPEVVQK|AQF|KRECPS|FAWE|RDRL|LQEN|VCTNDN|PSVSS|NRVLRNL
Sof-Pax258/1-127 PGV|GGSKPKVATPKVVDA|CKY|KREN|TM|FAWE|RDRL|SEN|CSQDNV|PSVSS|NR|VRNK
Hau-Pax258/1-126 PGV|GGSKPKVATPKVVDA|CKY|KREN|TM|FAWE|RDRL|LAEGV|CDQENV|PSVSS|NR|VRNK
Obi-Pax258/1-96 PGV|GGSKPKVATPKVVDA|ARY|KREN|TF|FSWE|RD-----
Cgi-Pax2A/1-127 PGV|GGSKPKVATPKVVDA|TRY|KREN|TM|FAWE|RDRL|LAEGV|CTAENV|PSVSS|NR|VRNK
Has-Pax258/1-79 PGV|GGSKPKVATPKVVDA|TRY|KREN|TF|-----
Pdu-Pax258/1-127 PGV|GGSKPKVATPKVVGA|CKY|KREN|TM|FAWE|RDRL|LAEGV|CDQENV|PSVSS|NR|VRNK
Dme-Sv/1-126 AGV|GGSKPKVATPKVVDA|ANY|KREN|TM|FAWE|RDRL|LAEA|CSQDNV|PSVSS|NR|VRNK
Sof-Pax37/1-127 PGV|GGSKPRVATPEVEKR|IEY|KKN|PG|FSWE|RD|KL|KEG|CDRSTV|PSVSS|SRVLR|SR
Hau-Pax37A/1-126 PGA|GGSKPRVATPEVEKK|IEY|KKN|DPS|FSWE|RERL|KEG|CDRSTV|PSVSS|SRVLR|SR
Cgi-Pax7/1-127 PGV|GGSKPRVATPEVEKK|IEY|KKN|DPS|FSWE|RDRL|KEG|CDRSTV|PSVSS|SRVLR|SR
Dme-prdA/1-127 PGV|GGSKPRVATPEVEKK|IEY|KKN|DPS|FSWE|RDRL|KEG|CDRSTV|PSVSS|SRVLR|SR

```

A- Alignement du domaine paired des gènes *pax6*, *pax2/5/8* et *pax3/7* de différentes espèces de céphalopodes et autres bilatériens. *Cgi* : *Crassostrea gigas* (*Cgi-Pax6* : EKC31583.1 ; *Cgi-Pax2/5/8* : EKC36239.1 ; *Cgi-Pax3/7* : EKC41820.1) ; *Dme* : *Drosophila melanogaster* (*Dme-Ey*, pour *eyeless* homologue de *pax6* : NM_166789.2 ; *Dme-Sv*, pour *shaven* ou *sparkling* homologue de *pax2/5/8* : NM_001169363.2 ; *Dme-prdA*, pour *paired* homologue de *pax3/7* : NM_078832.2) ; *Esc* : *Euprymna scolopes* (*Esc-Pax6* : AF513712.1) ; *Has* : *Haliotis asinina* (*Has-Pax6* : AF231947.1) ; *Hau* : *Helobdella sp.* (*Hau-Pax6B* : EF394359.2 ; *Hau-Pax2/5/8* : JQ654099.1 ; *Hau-Pax3/7A* : DQ858213.1) ; *Ipa* : *Idiosepius paradoxus* (*Ipa-Pax6* : AB716347.1) ; *Lop* : *Loligo opalescens* (*Lop-Pax6* : U59830.1) ; *Obi* ; *Octopus bimaculoïdes* (*Obi-Pax2/5/8* : FJ876144.1) ; *Ovu* : *Octopus vulgaris* (*Ovu-Pax6* : HM104274.1) ; *Pdu* : *Platynereis dumerilii* (*Pdu-Pax6* : AM114770.1 ; *Pdu-Pax2/5/8* : KC109637.1 ; *Pdu-Pax3/7* : EF384211.1) ; *Sof* : *Sepia officinalis*.

Annexe 5 B



B- Arbre phylogénétique (neighbor-joining phylogenetic tree, 1000 bootstrap replications) basé sur l'étude de distance effectué à partir de l'alignement des domaines paired des gènes *pax* présentés en A- La séquence de la Tc1-like transposase de *Drosophila melanogaster* (Dme-trans : Q27281) sert de référence hors groupe, les domaines paired dériveraient d'une transposase ancestrale de ce type (Breitling & Gerber, 2000). Les séquences de *Sepia officinalis* se répartissent comme attendu dans 3 groupes distincts (groupes soulignés), regroupant les homologues des gènes *pax6*, *pax2/5/8* et *pax3/7*, ce qui réaffirme leur identité respective.

Annexe 6

Fragment du gène *Sof-elavI*: de 1 à 687 nt.

Accession GenBank : HE956712.1.

Traduction: 229 a.a.

```
1  N Y L P Q T M T Q E E I R S L F A S I G 20
1  aactatcttccacaacaatgactcaggaggaaatacgttcgctgtttgctagcattgga 60
21  E V E S C K L I R D K P T A M N T L R Q 40
61  gaagtggagagctgcaaattaatcagagataaaccaacagcaatgaacacgctgaggcaa 120
41  N D I D Q G L P E T A M N T M R Q N D I 60
121 aacgatatagatcaaggactgccggaacagcaatgaacacaatgagacagaatgatata 180
61  D Q G T L E S G Q S L G Y G F V N Y K Y 80
181 gatcaaggaacactggaatcaggtcaaagtttagggtatggatttgtaactacaaatac 240
81  P S D A E K A I N T L N G L R L Q N K T 100
241 cctagtgatgcagaaaaggccatcaacaccttgaatggattaagattacagaataaaaca 300
101 I K V S Y A P P S S E S I K G A N L N I 120
301 ataaaggtttcatatgccccaccagcagtgaaagcattaaaggggcaacttgaacata 360
121 G G F A K S F T Q L E L G K F V F P V G 140
361 ggtggctttgcccaagtctttcactcaattggaacttggaaaatttgttttccagtgggg 420
141 I L K H S R I L K K I T Q F Y K K G L V 160
421 attctaaaacactcccgaatccttaagaaaataacacagttttataaaaaggggttggtt 480
161 F P I Y P T S L N L K E P F R I D W A F 180
481 tttccgatttatccaaccagcttaaacctgaaagaaccattcagaattgactgggccttt 540
181 T G K N N E N L L R V E F V N F P S S N 200
541 accgggaagaacaacgaaaacctactacgggtggaatttggaatttcccaagctcaa 600
201 K N W G P S F L L H A P I L F P Y A A E 220
601 aaaaattggggaccctcttttcttttgacgctcctattttatttcctacgcggctgaa 660
221 F W V P T Y H C S 229
661 ttttgggtccccacttatcattgcagt 687
```

En marron : RRM1 et 2

Amorce Forward: 5'aactatcttccacaacaat 3' (NYLPQTM)

Amorce Reverse: 5'gccctttaatgctttcact 3' (SESIKGA)

Amplification de 347 pb.

Annexe 7

Fragment du gène *Sof-msi* : de 1 à 720 nt.

Accession > ADY0AAA111YF13CM1

Traduction : 240 a.a.

```
1 M K M D P Q T Q Q T N A T D E I P N D P 20
1 atgaagatggacccccaaaccagcagacgaacgctactgacgagattcctaacgatccg 60

21 G K M F I G G L S W Q T T A D G L R E Y 40
61 gggaaaatgtttataggagggtctgagttggcaaacgacagcagatgggtctcagggagtac 120

41 F G K F G E I K E A M V M K D P A T K R 60
121 tttggaaaatttgggggagattaaggaagctatgg tcataaagaccctgcaacaaaacgt 180

61 S R G F G F V T F R D P A S V E K V L A 80
181 tcacggggattcgggttttgttacatctcgggatcctgctagcgtggagaaagttctagca 240

81 N G P H E L D S K T V D P K V A F P R K 100
241 aatggaccgcatgaactggattcaaaaacggttgacccaaaggttgcttttccgaggaaa 300

101 A Q P K M V T R T K K I F V G G L S A S 120
301 gcccaacctaagatgggttactcgcacgaagaagatatttgtgggtgggctttcagcttct 360

121 T T V E D V R N Y F S Q I G K V E D A M 140
361 acgactgtggaagatgtgaggaactatctcagtc aaattggaaaggtggaagatgcaatg 420

141 L M F D K T T N R H R G F G F V T F E S 160
421 cttatgtttgataagacaactaacagacatcgaggttttggttttgtaacatttgagagt 480

161 E D V V D K V C E I H F H E I N K K M V 180
481 gaggatgtagtggacaaggtctgagagattcattttcatgagatcaacaaaaaatggtt 540

181 E C K K A Q P K E V M L P T T L A A R G 200
541 gaatgcaaaaaagcacaacc caaagaagtcagtgccaaccactctggctgcacgtggt 600

201 R G L P R G A Y M T T D G E V V W D M P 220
601 cgaggctctgcctcggggagcctacatgacaacggatggcgaagttgtgtgggatatgcc 660

221 K Q L I L P E F C A P E L L A S P C F A 240
661 aagcaactaatcctgctgaattctgcgcccctgaacttcttgcaagcccgtgttttgcc 720
```

RRM1

Amorce Forward: 5'tcatgaaagaccctgcaac 3' (VMKDPAT)

Amorce Reverse: 5'ttggcagcatgacttctttg 3' (KEVMLP)

Amplification de 436 pb.

Annexe 8

Fragment du gène *Sofnk2.1* : de 1 à 885nt.

Traduction : 295 a.a.

```
1 gtgtgcaagttggacgtgtctgttagtaccggttgagagcatgtctctcagcccgaagcat 60
1 V C K L D V S V V P L E S M S L S P K H 20

61 actacacacctttcagcgtaacagatattttaagtcctattgaggaaacgtacaaaaaaaaacg 120
21 T T P F S V T D I L S P I E E T Y K K T 40

121 acaattgaggcatctattccgcccccgctcttatagaaattcgcaacaccccccaagccggt 180
41 T I E A S I P P P S Y R N S Q H P Q A G 60

181 ggcgtcactggaatgagtggttacgggtgtccagcctgcttcctcggcctatcacaactat 240
61 G V T G M S V T G V Q P A S S A Y H N Y 80

241 gttccaccattgtctcatcacacaccatcttttacaacacagtattgtaacgggtcggac 300
81 V P P L S H H T P S F T T Q Y C N G S D 100

301 atagggcattatggcgacgctcgacaaaacaacaccccgatggtatactacaaaccctgat 360
101 I G H Y G D A R Q T T P G W Y T T N P D 120

361 ccacgattttacgaattttgtccagaactgcaggagttaccaacatggatcgaggaggaa 420
121 P R F T N F V Q N C R S Y P T W I E E E 140

421 gtttctcgtcttatgggcacgagttcgtgtgccatgtcgcggatgtcgtcctccatgagc 480
141 V S R L M G T S S C A M S P M S S S M S 160

481 catgtaaatatgtctgccctcggcgggtctggaccagaagccgcccggcgtacgatttct 540
161 H V N M S A L G G L D Q K P P G V R F P 180

541 atcacccaaacgacgaaaacgacgagtagtactattttcacaagcgaagtttatgaattagaa 600
181 I T Q R R K R R V L F S Q A Q V Y E L E 200

601 cggcgcttttaaaacacagaaatattctctccgctccagaatgggaacatctcgcagcatg 660
201 R R F K T Q K Y L S A P E W E H L A S M 220

661 atcaatttgacccccacacaggtaaaaatctggttccaaaacccccgctacaagtgcaac 720
221 I N L T P T Q V K I W F Q N P R Y K C N 240

721 ccccacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaataaaaaagcattctcagtcccccacaaagcaacaaa 780
241 P H K K K K K K M K S I L S P H K A T K 260

781 aaaaaaaaaaaaaaaaaataaaaaacgggtgtcatcctccccccccgcgagtgaggagtc 840
261 T K K K N N K T G C H P P P P R V G V P 280

841 gggccgggggaaaaaaggcaaacctggcccttcgggtaaggaggaaaccacccccag 900
281 G P G E K R Q T L A L R V R E E T T P Q 300

901 ttccaaaaccgggccccttcaatg 924
301 F Q N R A P S M 308
```

Amorce Forward : 5' tgtctctcagcccgaagcat 3' (MSLSPKH)

Amorce Reverse : 5' cagttctggacaaaattcgt 3' (TNFVQNC) Amplification de 350 pb.

Homéodomaine

Domaine N-terminal

Annexe 9

Fragment du gène *Sof-otx2*: de 1 to 735 nt.

Accession >ADY0AAA16YG19CM1

Traduction : 245 a.a.

```
1 L R I A Y I I R S Y Q S T V P D I C P G 20
1 cttcgtatagcatacattatacgaagttatcagtcgacggtagccggacatatgccccggga 60

21 I R P L R P G S A P T T K A P P Y S V N 40
61 attcggccattacggccgggatcagcaccacgactaaagcccctccatactcgggtaac 120

41 G L S L T S P N V D I L H P A M S Y Q E 60
121 ggactaagtctcacatcgccaaatggtgatattttgcatccagctatgagttaccaagaa 180

61 L D M R P A H Q V S G T L E L Y V I E R 80
181 ctggacatgagaccagctcatcaagtctctggaactctggagttgtacgttattgaaacga 240

81 T D D F R N M G N D L I Y S R K V G D S 100
241 acggatgacttcaggaaacatgggtaacgatttgatatactctagaaaagtgggagattct 300

101 E T F L A A N P R K Q R R E R T T F S R 120
301 gaaacattccttgctgctaataccccgggaagcagagaaaggaacggacaaccttctctcgt 360

121 A Q L D V L E A L F Q K T R Y P D T F M 140
361 gccaaacttgatgtacttgaagcactatttcagaagacgcggttaccagacacttttcatg 420

141 R E E V A L K I N L P E S R V Q V W F K 160
421 cgagaggaagtggcattgaaaatcaacctcccagagtcgagagtgacaggtatggtttaag 480

161 N R R A K C R Q Q Q K A Q E G K K P T P 180
481 aatcgccgcgcaaatgccgacagcagcagaaaagctcaggaaggtaaaaagccgaccccg 540

181 K K T K S P S P P T S S P G T P S Y K T 200
541 aaaaagacaaagtctccatcaccgcccagaccagttccccagggactccttcttacaagact 600

201 I S V L S V H D L M G P N S C M Q R T G 220
601 atttctgtactttctgtccatgatcttgatgggcccataatagctgcatgcagcggacagga 660

221 Y P M T K C K T A A Y T P Q N Y R H S G 240
661 tacccaatgaccaaagtgtaaaactgctgctgctacactccccaaaattaccgccattctggt 720

241 Y Y G N L 245
721 tactatggcaacttg 735
```

Otx1 transcription factor

Homéodomaine

Amorce Forward: 5'acgaacggatgacttcagg 3' (ERTDDFR)

Amorce Reverse: 5'cagctattaggccatcaa 3' (LMGPNSC)

Amplification de 470 pb.

Annexe 10

Frangment du gène *Sof-gsx*: de 1 à 471 nt.

Primers dégénérés dessinés à partir d'*Euprymna scolopes*, GenBank : AY675202.1

Traduction : 157 a.a.

```
1 G Y L R A I D L A A A N S P F Q S S K R 20
1 GGGTATCTAAGGGCGATTGATTTAGCGGCCGGAATTCGCCCTTCCAGAGCAGCAAAAAGA 60
21 I R T A F T S T Q L L E L E R E F A S N 40
61 ATCCGCACAGCGTTTACAAGCACTCAATTATTGGAGCTTGAAAGAGAGTTTGCTTCCAAC 120
41 M Y L S R L R R T E I A T Y L N L S E K 60
121 ATGTACCTGTCTCGTCTGCGTACCGAGATTGCCACTTACCTAAATTTGTCTGAAAAG 180
61 Q V K I W F Q N R R V K Y K K E G T N E 80
181 CAGGTGAAAATCTGGTTTCAGAACCGTCGGGTCAAGTACAAGAAAGAAGGTACCAATGAA 240
81 P G E K C R C L R T C S S R N N V D R K 100
241 CCTGGGGAAAAGTGCCGATGCTTAAGAACCTGTTCTTCACGGAACAATGTAGACCGGAAG 300
101 K S N G T G N G D T N G D I I C N K I S 120
301 AAAAGCAATGGAACCGGAAATGGAGACACAAACGGTGACATCATCTGCAATAAGATTTCA 360
121 R M D T D S P D E G S P L L I D T T H R 140
361 CGAATGGATACAGACTCTCCTGATGAGGGAAGTCCTCTTTTGATAGATACAACGCACCGT 420
141 C D S P S S Q E G R I R L N L Q D 157
421 TGCGATTACCGTCAAGTCAAGAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGAC 471
```

Homéodomaine

Amorce Forward: 5'ccagagcagcaaaagaatcc 3' (QSSKRI)

Amorce Reverse: 5'cttgacttgacggtgaatcg 3' (DSPSSQ)

Amplification de 390 pb.

BIBLIOGRAPHIE

- Acampora, D., Simeone, A. (1999). Understanding the roles of Otx1 and Otx2 in controlling brain morphogenesis. *TINS*. 22, 116-122.
- Acampora, D., Avantaggiato, V., Tuorto, F., Simeone, A. (1997). Genetic control of brain morphogenesis through Otx gene dosage requirement. *Development*. 124, 3639-3650.
- Acampora, D., Gulisano, M., Simeone, A. (2000). Genetic and molecular roles of Otx homeodomain proteins in head development. *Gene*. 246, 23-35.
- Akamatsu, W., Okano, H.J., Osumi, N., Inoue, T., Nakamura, S., Sakakibara, S., Miura, M., Matsuo, N., Darnell, R.B., Okano, H. (1999). Mammalian ELAV-like neuronal RNA-binding proteins HuB and HuC promote neuronal development in both the central and the peripheral nervous systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(17), 9885-9890.
- Akiyama-Oda, Y., Oda, H. (2006). Axis specification in the spider embryo: dpp is required for radial-to-axial symmetry transformation and sog for ventral patterning. *Development*. 133, 2347-2357.
- Amato, M.A., Boy, S., Arnault, E., Girard, M., Della Puppa A., Sharif, A., Perron, M. (2005). Comparison of the expression patterns of five neural RNA binding proteins in the *Xenopus* retina. *J Comp Neurol*. 481(4), 331-339.
- Arenas-Mena, C., Wong, K.S. (2007). HeOtx expression in an indirectly developing polychaete correlates with gastrulation by invagination. *Dev Genes Evol*. 217, 373-384.
- Arendt, D., Nübler-Jung, K. (1994). Inversion of dorsoventral axis? *Nature*. 371, 326.
- Arendt, D., Nübler-Jung, K. (1999). Comparison of early nerve cord development in insects and vertebrates. *Development*. 126, 2309-2325.
- Arendt, D., Tessmar, K., de Campos-Baptista, M.I., Dorresteyn, A., Wittbrodt, J. (2002). Development of pigment-cup eyes in the polychaete *Platynereis dumerilii* and evolutionary conservation of larval eyes in Bilateria. *Development*. 129(5), 1143-1154.
- Arendt, D. (2003). Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int J Dev Biol*. 47(7-8), 563-571. Review.
- Arendt, D., Denes, A.S., Jekely, G., Tessmar-Raible, K. (2008). The evolution of nervous system centralization. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 363, 1523-1528.
- Arendt, D., Hausen, H., Purschke, G. (2009). The 'division of labour' model of eye evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 364(1531), 2809-2817. Review.
- 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 (Jena)*. 114(2), 113-122.

- Bailey, A.M., Posakony, J.W. (1995). Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev.* 9, 2609-2622.
- Bandel, K., Boletzky, S.V. (1988). Features of development and functional morphology required in the reconstruction of early coleoid cephalopods. In J. Wiedmann, and J. Kullmann (editors), *Proceedings of the 2nd International Cephalopod Symposium, Cephalopods—Present and Past*, pp. 229–246. Stuttgart: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.
- 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.
- 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.
- 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*. in press.
- Bellefroid, E.J., Bourguignon, C., Hollemann, T., Ma, Q., Anderson, D.J., Kintner, C., Pieler, T. (1996). X-MyT1, a *Xenopus* C2HC-type zinc finger protein with a regulatory function in neuronal differentiation. *Cell.* 87, 1191-1202.
- Bellingham, J., Morris, A.G., Hunt, D.M. (1998). The rhodopsin gene of the cuttlefish *Sepia officinalis*: sequence and spectral tuning. *J Exp Biol.* 201(15), 2299-2306.
- Berger, C., Renner, S., Luer, K., Technau, G.M. (2007). The commonly used marker ELAV is transiently expressed in neuroblasts and glial cells in the *Drosophila* embryonic CNS. *Dev Dyn.* 236, 3562-3568.
- Bertrand, N., Castro, D.S., Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci.* 3, 517-530.
- Bhat, K.M. (1999). Segment polarity genes in neuroblast formation and identity specification during *Drosophila* neurogenesis. *Bioessays.* 21, 472-485.
- Biemar, F., Devos, N., Martial, J.A., Driever, W., Peers, B. (2001). Cloning and expression of the TALE superclass homeobox *Meis2* gene during zebrafish embryonic development. *Mech Dev.* 109, 427-433.
- Boletzky, S.v. (1988). Characteristics of Cephalopod embryogenesis. In: *Cephalopods - Present and Past*. Ed. J. Wiedmann and J. Kullmann, pp. 167-179, Stuttgart.
- Boletzky, S.v. (1989). Recent studies on spawning, embryonic development, and hatching in the Cephalopoda. *Adv Mar Biol.* 25, 85-115.
- Boletzky, S.v. (2003). Biology of early life stages in cephalopod molluscs. *Adv Mar Biol.* 44, 143-203. Review.
- Bonar, D.B. (1972). Fate of larval organs at metamorphosis in a gastropod. *American Zoologist* 12, 722.

- Bonar, D.B. (1976). Molluscan metamorphosis: a study in tissue transformation. *American Zoologist*. 16, 573-591.
- Bonnaud, L., Boucher-Rodoni, R., Monnerot, M. (1997). Phylogeny of cephalopods inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*. 7(1), 44-54.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C.Q., Technau, G.M. (1996). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroecto-derm. *Dev. Biol*. 179, 41-64.
- Boucaud-Camou, E., Boismery, J. (1991). The migrations of the cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) in the English Channel. In: Boucaud-Camou E., editor. *The Cuttlefish*. Université de Caen. p. 179-189.
- Boycott, B.B., Young, J. Z. (1956). Reactions to shape in *Octopus vulgaris* Lamarck. *PTOC. zool. Soc. Lond*. 136, 491-547.
- Boycott, B.B., (1961). The functional organization of the brain of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Proc R Soc B*. 153, 503-534.
- Breitling, R., Gerber, J.K. (2000). Origin of the paired domain. *Dev Genes Evol*. 210(12), 644-650.
- Briscoe, J. (2009). Making a grade: Sonic Hedgehog signalling and the control of neural cell fate. *Embo J*. 28, 457-465.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T.M., Ericson, J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell*. 101, 435-445.
- Brooke, N.M., Garcia-Fernández, J., Holland, P.W. (1998). The *ParaHox* gene cluster is an evolutionary sister of the *Hox* gene cluster. *Nature*. 392, 920-922.
- Broom, D.M. (2007). Cognitive ability and sentience: which aquatic animals should be protected? *Dis Aquat Organ*. 75(2), 99-108. Review.
- Bruner, E., Holloway, R.L. (2010). A bivariate approach to the widening of the frontal lobes in the genus *Homo*. *J Hum Evol*. 58(2), 138-146.
- 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. (1979). Hair cell polarization in the gravity receptor system of the statocysts of the cephalopods *Sepia officinalis* and *Loligo vulgaris*. *Brain Res*. 160, 261-270.
- Budelmann, B.U., Bleckmann, H. (1988). A lateral line analogue in cephalopods: water waves generate microphonic potentials in the epidermal head lines of *Sepia* and *Lolliguncula*. *J Comp Physiol A*. 164, 1-5.
- Budelmann, B.U., Reise, U., Bleckmann, H. (1991). Structure, Function, biological significance of the cuttlefish "lateral line". *La seiche – The cuttlefish*, 1st International Symposium on the cuttlefish *Sepia*, Caen, June 1-3 1989. Ed. E. Boucaud-Camou, pp 201-209. University of Caen.
- Budelmann, B.U. (1996). Active marine predators: the sensory world of cephalopods. *Mar. Fresh. Behav. Physiol*. 27, 59-75.

Budelmann, B.U., (1995). The cephalopod nervous system; what evolution has made of the molluscan design. In: The nervous systems of invertebrates, an evolutionary and comparative approach. Ed. Breidbach O., Kutsch W., pp 115-138, Basel.

Budelmann, B.U. (1998). Autophagy in octopus. *S Afr J Mar Sci.* 20, 101-108.

Bulfone, A., Caccioppoli, C., Pardini, C., Faedo, A., Martinez, S., Banfi, S. (2004). Pcp411, a novel gene encoding a Pcp4-like polypeptide, is expressed in specific domains of the developing brain. *Gene Expr Patterns.* 4(3), 297-301.

Bullock, T.H., Horridge, G.A. (1965). Structure and function in the nervous systems of invertebrates. Freeman, San Francisco and London.

Buresi, A., Baratte, S., Da Silva, C., Bonnaud, L. (2012). orthodenticle/otx ortholog expression in the anterior brain and eyes of *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda). *Gene Expr Patterns.* 12, 109-116.

Callaerts, P., Halder, G., Gehring, W.J., 1997. Pax6 in Development and Evolution. *Annu. Rev. Neurosci.* 20, 483-532.

Campos, A.R., Grossman, D., White, K. (1985). Mutant alleles at the locus *elav* in *Drosophila melanogaster* lead to nervous system defects. A developmental-genetic analysis. *J Neurogenet.* 2(3), 197-218.

Campos-Ortega, J.A. (1998). The genetics of the *Drosophila* achaete-scute gene complex: a historical appraisal. *Int J Dev Biol.* 42, 291-297.

Cañestro, C., Bassham, S., Postlethwait, J.H. (2008). Evolution of the thyroid: anterior-posterior regionalization of the *Oikopleura* endostyle revealed by *Otx*, *Pax2/5/8*, and *Hox1* expression. *Dev Dyn.* 237(5), 1490-1499.

Cheesman, S.E., Layden, M.J., Von Ohlen, T., Doe, C.Q., Eisen, J.S. (2004). Zebrafish and fly *Nkx6* proteins have similar CNS expression patterns and regulate motoneuron formation. *Development.* 131, 5221-5232.

Chichery, R., Chanelet, J., (1976). Motor and behavioral responses obtained by stimulation with chronic electrodes of the optic lobe of *Sepia officinalis*. *Brain Res.* 105, 525-532.

Chichery, R., Chanelet, J., (1978). Motor responses obtained by stimulation of the peduncle lobe of *Sepia officinalis* in chronic experiments. *Brain Res.* 150, 188-193.

Cohen, S.M., Jürgens, G. (1990). Mediation of *Drosophila* head development of gap-like segmentation genes. *Nature.* 346, 482-488.

Conrad, A.H., Albrecht, M., Pettit-Scott, M., Conrad, G.W. (2009). Embryonic corneal Schwann cells express some Schwann cell marker mRNAs, but no mature Schwann cell marker proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50(9), 4173-4184.

Croll, R.P. (2000). Insights into early molluscan neuronal development through studies of transmitter phenotypes in embryonic pond snails. *Microsc Res Tech.* 49(6), 570-578.

Cubas, P., de Celis, J. F., Campuzano, S., Modolell, J. (1991). Proneural clusters of achaete-scute expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes Dev.* 5, 996-1008.

- Cuvier, G. (1830). *Considérations sur les Mollusques, et en Particulier sur les Cephalopodes*. *Ausules des Sciences Naturelles*. 19, 241-259.
- Darwin, C. (1859). *The origin of species*. John Murray, Londres.
- De Robertis, E.M. (2008). Evo-devo: variations on ancestral themes. *Cell*. 132, 185-195.
- De Robertis, E.M., Sasai, Y. (1996). A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature*. 380, 37-40.
- Denes, A.S., Jekely, G., Steinmetz, P.R., Raible, F., Snyman, H., Prud'homme, B., Ferrier, D.E., Balavoine, G., Arendt, D. (2007). Molecular architecture of annelid nerve cord supports common origin of nervous system centralization in bilateria. *Cell*. 129, 277-288.
- 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*). *Neurobiology of Learning and Memory*. 67, 150-160.
- Dickel, L., Chichery, M.P., Chichery, R. (1998). Time differences in the emergence of short and long term memory during postembryonic development in the cuttlefish, *Sepia*. *Behavioural Processes*. 44, 81-86.
- Dickinson, A.J., Croll, R.P. (2003). Development of the larval nervous system of the gastropod *Ilyanassa obsoleta*. *J Comp Neurol*. 466, 197-218.
- 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(3), 305-315.
- Dobzhansky, T. (1937). Further Data on the Variation of the Y Chromosome in *Drosophila Pseudoobscura*. *Genetics*. 22, 340-346.
- Dohrn, A. (1875). *Der Ursprung der Wirbelthiere und das princip des Functionswechsels* (Leipzig: Wilhelm Engelmann).
- Dray, N., Tessmar-Raible, K., Le Gouar, M., Vibert, L., Christodoulou, F., Schipany, K., Guillou, A., Zantke, J., Snyman, H., Behague, J. (2010). Hedgehog signaling regulates segment formation in the annelid *Platynereis*. *Science*. 329, 339-342.
- Dubois, L., Bally-Cuif, L., Crozatier, M., Moreau, J., Paquereau, L., Vincent, A. (1998). *XCoe2*, a transcription factor of the Col/Olf-1/EBF family involved in the specification of primary neurons in *Xenopus*. *Curr Biol*. 8, 199-209.
- Duman-Scheel, M., Xuelin, L., Orlov, I., Noll, M., Patel, N. H. (1997). Genetic separation of the neural and cuticular patterning functions of gooseberry. *Development*. 124, 2855-2865.
- Fainsod, A., Steinbeisser, H., De Robertis, E.M. (1994). On the function of BMP-4 in patterning the marginal zone of the *Xenopus* embryo. *EMBO J*. 13, 5015-5025.
- Farfan, C., Shigeno, S., Nödl, M.T., De Couet, H.G. (2009). Developmental expression of *apterous/Lhx2/9* in the sepiolid squid *Euprymna scolopes* supports an ancestral role in neural development. *Evol Dev*. 11, 354-362.

- Ferreiro, B., Skoglund, P., Bailey, A., Dorsky, R., Harris, W.A. (1993). XASH1, a *Xenopus* homolog of achaete-scute: a proneural gene in anterior regions of the vertebrate CNS. *Mech Dev.* 40(1-2), 25-36.
- Finkelstein, R., Smouse, D., Capaci, T.M., Spradling, A.C., Perrimon, N. (1990). The orthodenticle gene encodes a novel homeo domain protein involved in the development of the *Drosophila* nervous system and ocellar visual structures. *Genes Dev.* 4, 1516-1527.
- Finnerty, J.R., Paulson, D., Burton, P., Pang, K., Martindale, M.Q. (2003). Early evolution of a homeobox gene: the parahox gene *Gsx* in the Cnidaria and the Bilateria. *Evol Dev.* 5, 331-345.
- Francois, V., Solloway, M., O'Neill, J.W., Emery, J., Bier, E. (1994). Dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo depends on a putative negative growth factor encoded by the short gastrulation gene. *Genes Dev.* 8, 2602-2616.
- Friedrich, S., Wanninger, A., Brückner, M., Haszprunar, G. (2002). Neurogenesis in the mossy chiton, *Mopalia muscosa* (Gould) (Polyplacophora): evidence against molluscan metamerism. *J Morphol.* 253(2), 109-117.
- Frigerio, G., Burri, M., Bopp, D., Baumgartner, S., Noll, M. (1986). Structure of the segmentation gene paired and the *Drosophila* PRD gene set as part of a gene network. *Cell.* 47(5), 735-746.
- Fröbius, A.C., Seaver, E.C. (2006). ParaHox gene expression in the polychaete annelid *Capitella* sp. I. *Dev Genes Evol.* 216, 81-88.
- Frösch, D. (1971). Quantitative Untersuchungen am Zentralnervensystem der Schlüpfstadien von zehn mediterranen Cephalopodenarten. *Rev Suisse Zool.* 78, 1069-1122.
- Galliot, B., de Vargas, C., Miller, D. (1999). Evolution of homeobox genes: Q50 Paired-like genes founded the Paired class. *Dev Genes Evol.* 209(3), 186-197.
- Galliot, B., Quiquand, M. (2011). A two-step process in the emergence of neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 34, 847-862.
- Garstang, W. (1894). Preliminary note on a new theory of the ancestry of the Chordata. *Zool. Anz.* 17, 122-125.
- Gavalas, A., Krumlauf, R. (2000). Retinoid signalling and hindbrain patterning. *Curr Opin Genet Dev.* 10, 380-386.
- Gehring, W.J., Qian, Y.Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A.F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G., Wüthrich, K. (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell.* 78(2), 211-223. Review.
- Gehring, W.J., Ikeo, K. (1999). Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.* 15, 371-377.
- Geoffroy Saint Hilaire, E. (1822). Considérations générales sur la vertèbre. *Mém. Mus. His. Nat.* 9, 89-119.
- Ghysen, A., Dambly-Chaudière, C. (1989). Genesis of the *Drosophila* peripheral nervous system. *Trends Genet.* 5, 251-255.

- Gomez-Skarmeta, J.L., Campuzano, S., Modolell, J. (2003). Half a century of neural pre patterning: the story of a few bristles and many genes. *Nat Rev Neurosci.* 4, 587-598.
- Good, P., Yoda, A., Sakakibara, S., Yamamoto, A., Imai, T., Sawa, H., Ikeuchi, T., Tsuji, S., Satoh, H., Okano, H. (1998). The human Musashi homolog 1 (MSI1) gene encoding the homologue of Musashi/Nrp-1, a neural RNA-binding protein putatively expressed in CNS stem cells and neural progenitor cells. *Genomics.* 52, 382-384.
- Goode, D.K., Elgar, G. (2009). The PAX258 gene subfamily: a comparative perspective. *Dev Dyn.* 238(12), 2951-2974.
- Gould, S.J. (1985). Geoffroy and the Homeobox. *Natural History.* 11, 12-23.
- Gould, S.J., Eldredge, N. (1972). "Punctuated equilibria: an alternative to phyletic gradualism" In T.J.M. Schopf, ed., *Models in Paleobiology.* San Francisco: Freeman Cooper. pp. 82-115.
- Graziadei, P. (1971). The nervous system of the arms. In: *The Anatomy of the Nervous System of Octopus vulgaris,* Young JZ. pp 44-61, Clarendon Press, Oxford
- Guerra, A. (2006). Ecology of *Sepia officinalis*. *Vie milieu.* 56(2), 97-107.
- Guner, B., Karlstrom, R.O. (2007). Cloning of zebrafish *nkx6.2* and a comprehensive analysis of the conserved transcriptional response to Hedgehog/Gli signaling in the zebrafish neural tube *Gene Expr Patterns.* 7(5), 596-605.
- Gunter, K.M., McLaughlin, E.A. (2011). Translational control in germ cell development: A role for the RNA-binding proteins Musashi-1 and Musashi-2. *IUBMB Life.* 63(9), 678-685.
- Hadrjys, T., DeSalle, R., Sagasser, S., Fischer, N., Schierwater, B. (2005). The *Trichoplax PaxB* gene: a putative Proto-PaxA/B/C gene predating the origin of nerve and sensory cells. *Mol Biol Evol.* 22(7), 1569-1578.
- Harfe, B.D., Fire, A. (1998). Muscle and nerve-specific regulation of a novel NK-2 class homeodomain factor in *Caenorhabditis elegans*. *Development.* 125, 421-429.
- Harris, M.P., Fallon, J.F., Prum, R.O. (2002). Shh-Bmp2 signaling module and the evolutionary origin and diversification of feathers. *J Exp Zool.* 294(2), 160-176.
- Hartmann, B., Lee, P.N., Kang, Y.Y., Tomarev, S., de Couet, H.G., Callaerts, P. (2003). Pax6 in the sepiolid squid *Euprymna scolopes*: evidence for a role in eye, sensory organ and brain development. *Mech Dev.* 120, 177-183.
- Heffer, A., Pick, L. (2013). Conservation and variation in Hox genes: how insect models pioneered the evo-devo field. *Annu Rev Entomol.* 58, 161-179. Review.
- Henningfeld, K.A., Locker, M., Perron, M. (2007). *Xenopus* primary neurogenesis and retinogenesis *Funct. Dev. Embryol.* 1, 26-36.
- Hernandez, R.E., Rikhof, H.A., Bachmann, R., Moens, C.B. (2004). *vhnf1* integrates global RA patterning and local FGF signals to direct posterior hindbrain development in zebrafish. *Development.* 131, 4511-4520.
- Herpin, A., Lelong, C., Becker, T., Rosa, F., Favrel, P., Cunningham, C. (2005). Structural and functional evidence for a singular repertoire of BMP receptor signal transducing proteins in

the lophotrochozoan *Crassostrea gigas* suggests a shared ancestral BMP/activin pathway. *FEBS J.* 272(13), 3424-3440.

Higuchi, S., Hayashi, T., Tarui, H., Nishimura, O., Nishimura, K., Shibata, N., Sakamoto, H., Agata, K. (2008). Expression and functional analysis of musashi-like genes in planarian CNS regeneration. *Mech Dev.* 125(7), 631-645.

Hinman, V.F., O'Brien, E.K., Richards, G.S., Degnan, B.M. (2003). Expression of anterior Hox genes during larval development of the gastropod *Haliotis asinina*. *Evol Dev.* 5, 508-521.

Hirota, Y., Okabe, M., Imai, T., Kurusu, M., Yamamoto, A., Miyao, S., Nakamura, M., Sawamoto, K., Okano, H. (1999). Musashi and seven in absentia downregulate Tramtrack through distinct mechanisms in *Drosophila* eye development. *Mech. Dev.* 87, 93-101.

Hochner, B., Brown, E. R., Langella, M., Shomrat, T., Fiorito, G. (2003). A learning and memory area in the octopus brain manifests a vertebrate-like long-term potentiation. *J. Neurophysiol.* 90, 3547-3554.

Holland, L.Z., Holland, N.D. (1996). Chordate origins of the vertebrate central nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 9, 596-602.

Holland, N.D. (2003). Early central nervous system evolution: an era of skin brains? *Nat Rev Neurosci.* 4, 617-627.

Holland, P.W., Garcia-Fernandez, J. (1996). Hox genes and chordate evolution. *Dev Biol.* 173, 382-395.

Holland, P.W., Takahashi, T. (2005). The evolution of homeobox genes: implications for the study of brain development. *Brain Res. Bull.* 66, 484-490. Review.

Homyk, T.Jr., Isono, K., Pak, W. (1985). Developmental and physiological analysis of a conditional mutation affecting photoreceptor and optic lobe development in *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenetics.* 2, 309-324.

Hoyle, W.E. (1886). Report on the Cephalopoda collected by H. M. S. Challenger during the years 1873–1876. Report on the Scientific Results of the Voyage of H. M. S. Challenger 1873–1876. *Zoology.* 16, 1-245.

Huang, F., Yang, Z., Yu, D., Wang, J., Li, R., Ding, G. (2012). Sepia ink oligopeptide induces apoptosis in prostate cancer cell lines via caspase-3 activation and elevation of Bax/Bcl-2 ratio. *Mar Drugs.* 10(10), 2153-2165.

Huang, K.L., Chiao, C.C. (2013). Can cuttlefish learn by observing others? *Anim Cogn.* 16(3), 313-320.

Hudson, C., Lemaire, P. (2001). Induction of anterior neural fates in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mech Dev.* 100, 189-203.

Hui, J.H., Raible, F., Korchagina, N., Dray, N., Samain, S., Magdelenat, G., Jubin, C., Segurens, B., Balavoine, G., Arendt, D., Ferrier, D.E. (2009). Features of the ancestral bilaterian inferred from *Platynereis dumerilii* ParaHox genes. *BMC Biol.* 7, 43.

Huxley, T.H. (1863). Evidence as to man's place in nature London ; Edinburg : Williams and Norgate, 1863.

- Illes, J.C., Winterbottom, E., Isaacs, H.V. (2009). Cloning and expression analysis of the anterior parahox genes, Gsh1 and Gsh2 from *Xenopus tropicalis*. *Dev Dyn.* 238, 194-203.
- Jacob, M.H. (1984). Neurogenesis in *Aplysia californica* resembles nervous system formation in vertebrates. *J Neurosci.* 4, 1225-1239.
- Jakob, W., Sagasser, S., Dellaporta, S., Holland, P., Kuhn, K. (2004). The Trox-2 Hox/ParaHox gene of *Trichoplax* (Placozoa) marks an epithelial boundary. *Dev Genes Evol.* 214, 170-175.
- Jang, C.C., Chao, J.L., Jones, N., Yao, L.C., Bessarab, D.A., Kuo, Y.M., Jun, S., Desplan, C., Beckendorf, S.K., Sun, Y.H. (2003). Two Pax genes, eye gone and eyeless, act cooperatively in promoting *Drosophila* eye development. *Development.* 130(13), 2939-2951.
- Jardón-Valadez, E., Bondar, A.N., Tobias, D.J. (2010). Coupling of retinal, protein, and water dynamics in squid rhodopsin. *Biophys J.* 99(7), 2200-2207.
- Jarman, A.P., Grau, Y., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1993). atonal is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Cell.* 73(7), 1307-1321.
- Jarman, A.P., Grell, E.H., Ackerman, L., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1994). atonal is the proneural gene for *Drosophila* photoreceptors. *Nature.* 369, 398-400.
- Jessell, T.M. (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet.* 1, 20-29.
- Kammermeier, L., Leemans, R., Hirth, F., Flister, S., Wenger, U., Wall-dorf, U., Gehring, W.J., Reichert, H. (2001). Differential expression and function of the *Drosophila* Pax6 genes eyeless and twin of eyeless in embryonic central nervous system development. *Mech. Dev.* 103, 71-78.
- Kerner, P., Degnan, S.M., Marchand, L., Degnan, B.M., Vervoort, M. (2011). Evolution of RNA-binding proteins in animals: insights from genome-wide analysis in the sponge *Amphimedon queenslandica*. *Mol Biol Evol.* 28, 2289-2303.
- Khan, S.J., Bajpai, A., Alam, M.A., Gupta, R.P., Harsh, S., Pandey, R.K., Goel-Bhattacharya, S., Nigam, A., Mishra, A., Sinha, P. (2013). Epithelial neoplasia in *Drosophila* entails switch to primitive cell states. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(24), 2163-2172.
- Kiefer, J.C., Jarman, A., Johnson, J. (2005). Pro-neural factors and neurogenesis. *Dev Dyn.* 234, 808-813.
- Kim, C.H., Ueshima, E., Muraoka, O., Tanaka, H., Yeo, S.Y., Huh, T.L., Miki, N. (1996). Zebrafish elav/HuC homologue as a very early neuronal marker. *Neurosci. Lett.* 216, 109-112.
- Kioussi, C., Gross, M.K., Gruss, P. (1995). Pax3: a paired domain gene as a regulator in PNS myelination. *Neuron.* 15(3), 553-562.
- Kocot, K.M., Cannon, J.T., Todt, C., Citarella, M.R., Kohn, A.B., Meyer, A., Santos, S.R., Schander, C., Moroz, L.L., Lieb, B., Halanych, K.M. (2011). Phylogenomics reveals deep molluscan relationships. *Nature.* 477(7365), 452-456.
- Koike, C., Nishida, A., Ueno, S., Saito, H., Sanuki, R., Sato, S., Furukawa, A., Aizawa, S., Matsuo, I., Suzuki, N., Kondo, M., Furukawa, T. (2007). Functional roles of Otx2 transcription factor in postnatal mouse retinal development. *Mol. Cell. Biol.* 27, 8318-8329.

- Koshida, S., Shinya, M., Mizuno, T., Kuroiwa, A. and Takeda, H. (1998). Initial anteroposterior pattern of the zebrafish central nervous system is determined by differential competence of the epiblast. *Development*. 125, 1957-1966.
- Kozmik, Z. (2005). Pax genes in eye development and evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 430-438.
- Kriks, S., Lanuza, G.M., Mizuguchi, R., Nakafuku, M., Goulding, M. (2005). Gsh2 is required for the repression of Ngn1 and specification of dorsal interneuron fate in the spinal cord. *Development*. 132, 2991-3002.
- Kröger, B., Vinther, J., Fuchs, D. (2011). Cephalopod origin and evolution: A congruent picture emerging from fossils, development and molecules: Extant cephalopods are younger than previously realised and were under major selection to become agile, shell-less predators. *Bioessays*. 33(8), 602-613.
- Kulakova, M.A., Cook, C.E., Andreeva, T.F. (2008). ParaHox gene expression in larval and postlarval development of the polychaete *Nereis virens* (Annelida, Lophotrochozoa). *BMC Dev Biol.* 8, 61.
- Kuo, D.H., Weisblat, D.A. (2011). A new molecular logic for BMP-mediated dorsoventral patterning, in the leech *Helobdella*. *Curr Biol.* 21(15), 1282-1288.
- Kurokawa, D., Sakurai, Y., Inoue, A., Nakayama, R., Takasaki, N., Suda, Y., Miyake, T., Amemiya, C.T., Aizawa, S. (2006). Evolutionary constraint on Otx2 neuroectoderm enhancers—deep conservation from skate to mouse and unique divergence in teleost. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(51), 19350-19355.
- Lacosta, A.M., Muniesa, P., Ruberte, J., Sarasa, M., Domínguez, L. (2005). Novel expression patterns of Pax3/Pax7 in early trunk neural crest and its melanocyte and non-melanocyte lineages in amniote embryos. *Pigment Cell Res.* 18(4), 243-251.
- Lapraz, F., Besnardeau, L., Lepage, T. (2009). Patterning of the dorsal-ventral axis in echinoderms: insights into the evolution of the BMP-chordin signaling network. *PLoS biology*. 7, 1000248.
- Lawn, I.D., Mackie, G.O., Silver, G. (1981). Conduction system in a sponge. *Science*. 211(4487), 1169-1171.
- Le Douarin, N.M., Kalcheim, C. (1999). *The Neural Crest*. 2nd Ed New York, NY: Cambridge University Press.
- Le Guyader, H. (1998). *Geoffroy Saint-Hilaire*. Ed. Belin, coll. Belin Sciences, Paris.
- Lecointre, G., Le Guyader, H. (2006). *Classification phylogénétique du vivant*. Ed. Belin, Paris.
- Lee, J.E., Hollenberg, S.M., Snider, L., Turner, D.L., Lipnick, N., Weintraub, H. (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science*. 268, 836-844.
- Lee, P.N., Callaerts, P., De Couet, H.G., Martindale, M.Q. (2003). Cephalopod Hox genes and the origin of morphological novelties. *Nature*. 424(6952), 1061-1065.

- Lemaire, J. (1970). Table de développement embryonnaire de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). *Bull Soc Zool France*. 95, 773-782.
- Lichtneckert, R., Reichert, H. (2005). Insights into the urbilaterian brain: conserved genetic patterning mechanisms in insect and vertebrate brain development. *Heredity*. 94, 465-477.
- Lin, M.F., Leise, E.M. (1996). NADPH-diaphorase activity changes during gangliogenesis and metamorphosis in the gastropod mollusc *Ilyanassa obsoleta*. *J Comp Neurol*. 374(2), 194-203.
- Lindgren, A.R., Giribet, G., Nishiguchi, M.K. (2004). A combined approach to the phylogeny of Cephalopoda (Mollusca). *Cladistics*. 20, 454-486.
- Liu, A., Niswander, L.A. (2005). Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci*. 6, 945-954.
- Llinás, R.R. (1999). *The Squid Giant Synapse : A Model for Chemical Transmission* Oxford University Press, USA
- Loosli, F., Köster, R. W., Carl, M., Krone, A. and Wittbrodt, J. (1998). Six3, a medaka homolog of the *Drosophila* homeobox gene *sine oculis* is expressed in the anterior embryonic shield and the developing eye. *Mech. Dev*. 74, 159-164.
- Lowe, C.J., Terasaki, M., Wu, M., Freeman, R.M., Jr., Runft, L., Kwan, K., Haigo, S., Aronowicz, J., Lander, E., Gruber, C. (2006). Dorsoventral patterning in hemichordates: insights into early chordate evolution. *PLoS biology*. 4, 291.
- Lowe, C.J., Wu, M., Salic, A., Evans, L., Lander, E., Stange-Thomann, N., Gruber, C.E., Gerhart, J., Kirschner, M. (2003). Anteroposterior patterning in hemichordates and the origins of the chordate nervous system. *Cell*. 113, 853-865.
- Lumsden, A., Krumlauf, R. (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science*. 274(5290), 1109-1115. Review.
- Lupo, G., Harris, W. A. Lewis, K.E. (2006). Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 7, 103-114.
- Ma, Q., Kintner, C., Anderson, D.J. (1996). Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87, 43-52.
- Maczkowiak, F., Matéos, S., Wang, E., Roche, D., Harland, R., Monsoro-Burq, A.H. (2010).. The Pax3 and Pax7 paralogs cooperate in neural and neural crest patterning using distinct molecular mechanisms, in *Xenopus laevis* embryos. *Dev Biol*. 340(2), 381-396.
- Maddock, L., Young, J.Z. (1987). Quantitative differences among the brains of cephalopods. *Journal of Zoology*. 212(4), 739-767.
- Mangold, K. (1989). Organes des sens. In : *Céphalopodes*, vol V. *Traité de zoologie, anatomie, systématique, biologie*. Eds Grassé P.P., Ed. Masson, pp 241–301, Paris.
- Mangold, K., Bidder, A. (1989). Appareils respiratoire et circulatoire: respiration et circulation. In : *Céphalopodes*, vol V. *Traité de zoologie, anatomie, systématique, biologie*. Eds Grassé P.P., Ed. Masson, pp 387-434, Paris.

- Mangold, K., Bidder, A., Portmann, A. (1989). Organisation générale des céphalopodes. In : Céphalopodes, vol V. Traité de zoologie, anatomie, systématique, biologie. Eds Grassé P.P., Ed. Masson, pp 7–69, Paris.
- Mansouri, A., Hallonet, M., Gruss, P. (1996). Pax genes and their roles in cell differentiation and development. *Curr Opin Cell Biol.* 8(6), 851-857.
- Marlow, H.Q., Srivastava, M., Matus, D.Q., Rokhsar, D., Martindale, M.Q. (2009). Anatomy and development of the nervous system of *Nematostella vectensis*, an anthozoan cnidarian. *Dev Neurobiol.* 69(4), 235-254.
- Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Rejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F., Gruss, P. (2001). Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell.* 105, 43-55.
- Marquis, F. (1989). Die Embryonalentwicklung des Nervensystem von *Octopus vulgaris* Lam. (Cephalopoda, Octopoda), eine histologische Analyse. *Verhandl Naturf Ges Basel.* 99, 23-75.
- Martinez-Morales, J.R., Signore, M., Acampora, D., Simeone, A., Bovolenta, P. (2001). Otx genes are required for tissue specification in the developing eye. *Development* 128, 2019-2030.
- Mather, J.A. (2008). Cephalopod consciousness: behavioural evidence. *Conscious Cogn.* 17, 37-48.
- Mähger, L.M., Roberts, S.B., Hanlon, R.T. (2010). Evidence for distributed light sensing in the skin of cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Biol Lett.* 6(5), 600-603.
- Matsunaga, E., Araki, I., Nakamura, H. (2000). Pax6 defines the di-mesencephalic boundary by repressing En1 and Pax2. *Development.* 127(11), 2357-2365.
- McCauley, D.W., Bronner-Fraser, M. (2002). Conservation of Pax gene expression in ectodermal placodes of the lamprey. *Gene.* 287, 129-139.
- McDonald, E.C., Xie, B., Workman, M., Charlton-Perkins, M., Terrell, D.A., Reischl, J., Wimmer, E.A., Gebelein, B.A., Cook, T.A. (2010). Separable transcriptional regulatory domains within Otd control photoreceptor terminal differentiation events. *Dev. Biol.* 347, 122-132.
- Meinhardt, H. (2004). Different strategies for midline formation in bilaterians. *Nat Rev Neurosci.* 5, 502-510.
- Messenger, J.B. (1973). Learning performance and brain structure: a study in development. *Br Res.* 58, 519-523.
- Meyer, N.P., Seaver, E.C. (2009). Neurogenesis in an annelid: characterization of brain neural precursors in the polychaete *Capitella* sp. I. *Dev Biol.* 335, 237-252.
- Miller, D.J., Hayward, D.C., Reece-Hoyes, J.S, Scholten, I., Catmull, J., Gehring, W.J., Callaerts, P., Larsen, J.E., Ball, E.E. (2000). Pax gene diversity in the basal cnidarian *Acropora millepora* (Cnidaria, Anthozoa): implications for the evolution of the Pax gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(9), 4475-4480.
- Miller, D.J., Technau, U. (2010). Understanding the evolution of multicellularity: insights from basal metazoans. *Bioessays.* 32(2), 175-178.

- Miller-Bertoglio, V.E., Fisher, S., Sanchez, A., Mullins, M.C., Halpern, M.E. (1997). Differential regulation of chordin expression domains in mutant zebrafish. *Dev Biol.* 192, 537-550.
- Millet, S., Bloch-Gallego, E., Simeone, A., Alavarado-Mallart, R.M. (1996) The caudal limit of *Otx2* gene expression as a marker of the midbrain/hindbrain boundary: a study using a chick-*Otx2* riboprobe and chick/quail homotopic grafts. *Development.* 122, 3785-3797.
- Minchin, J.E., Hughes, S.M. (2008). Sequential actions of Pax3 and Pax7 drive xanthophore development in zebrafish neural crest. *Dev Biol.* 317(2), 508-522.
- Mizuseki, K., Kishi, M., Matsui, M., Nakanishi, S., Sasai, Y. (1998). *Xenopus* Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction. *Development.* 125, 579-587.
- Mizutani, C.M., Meyer, N., Roelink, H., Bier, E. (2006). Threshold-dependent BMP-mediated repression: a model for a conserved mechanism that patterns the neuroectoderm. *PLoS Biology.* 4, 313.
- Mizutani, C.M., Bier E. (2008). EvoD/Vo: the origins of BMP signalling in the neuroectoderm. *Nat. Rev. Genet.* 9, 663-677.
- Moens, C.B., Yan, Y. L., Appel, B., Force, A.G., Kimmel, C. B. (1996). *valentino*: a zebrafish gene required for normal hindbrain segmentation. *Development.* 122, 3981-3390.
- Moor, B. (1983). Organogenesis. In *The Mollusca*, Vol. 3, Development (Eds. N.H. Verdonk, J.A.M. van den Biggelaar and A.S. Tampa). Academic Press. New York.. pp. 123-177.
- Morata, G. (2001). How *Drosophila* appendages develop. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(2), 89-97. Review.
- Morère , J.L., Pujol, R. (2003). *Dictionnaire raisonné de biologie.* Ed. Frison-Roche, Paris.
- Moroz, L.L. (2009). On the independent origins of complex brains and neurons. *Brain Behav Evol.* 74(3), 177-190. Review.
- Müller, G.B. (2007). Evo-devo: extending the evolutionary synthesis. *Nat Rev Genet.* 8(12), 943-949. Review.
- Müller, W.E., Skorokhod, A., Müller, I.M. (1999). Receptor tyrosine kinase, an autapomorphic character of metazoa: identification in marine sponges. *Acta Biol Hung.* 50(4), 395-411.
- Naef, A. (1928). “Die Cephalopoden. Embryologie, Fauna Flora Golf Neapel,” Smithsonian Institution Press, Washington , Vol. 35, pp. 1-357.
- Nakamura, M., Okano, H., Blendy, J.A., Montell, C. (1994). Musashi, a neural RNA-binding protein required for *Drosophila* adult external sensory organ development. *Neuron.* 13, 67-8.
- Nakanishi, N., Yuan, D., Hartenstein, V., Jacobs, D.K. (2010). Evolutionary origin of rhopalia: insights from cellular-level analyses of *Otx* and POU expression patterns in the developing rhopalian nervous system. *Evol. Dev.* 12, 404-415
- Nasution, S. (2003). Intra-Capsular Development in Marine Gastropod *Buccinum undatum* (Linnaeus 1758). *Journal Natur Indonesia.* 5(2), 124-128.

- 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.
- 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(7), 1944-1951.
- Nederbragt, A.J., Te Welscher, P., Van den Driesche, S., Van Loon, A.E., Dictus, W.J. (2002b). Novel and conserved roles for orthodenticle/otx and orthopedia/otp orthologs in the gastropod mollusc *Patella vulgata*. *Dev. Genes Evol*. 212, 330-337.
- Nederbragt, A.J., van Loon, A.E., Dictus, W.J. (2002c). Evolutionary biology: hedgehog crosses the snail's midline. *Nature*. 417(6891), 811-812
- Nederbragt, A.J., van Loon, A.E., Dictus, W.J. (2002a). Expression of *Patella vulgata* orthologs of engrailed and dpp-BMP2/4 in adjacent domains during molluscan shell development suggests a conserved compartment boundary mechanism. *Developmental Biology*. 246, 341-355.
- Nielsen, C. (2005). Trochophora larvae: cell-lineages, ciliary bands and body regions. 2. Other groups and general discussion. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 304, 401-447.
- Nishida, A., Furukawa, A., Koike, C., Tano, Y., Aizawa, S., Matsuo, I., Furukawa, T. (2003). Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat. Neurosci*. 6, 1255-1263.
- Nixon, M., Young, J.Z. (2003). *The brains and lives of Cephalopods*. Oxford University Press, Oxford. UK.
- Nomaksteinsky, M., Kassabov, S., Chettouh, Z., Stoeklé, H.C., Bonnaud, L., Fortin, G., Kandel, E.R., Brunet, J.F (2013). Ancient origin of somatic and visceral neurons. *BMC Biol*. 11, 53.
- O'Brien, E.K., Degnan, B.M. (2003). Expression of Pax258 in the gastropod statocyst: insights into the antiquity of metazoan geosensory organs. *Evol Dev*. 5, 572-578.
- Ogasawara, M., Shigetani, Y., Suzuki, S., Kuratani, S., Satoh, N. (2001). Expression of thyroid transcription factor-1 (TTF-1) gene in the ventral forebrain and endostyle of the agnathan vertebrate, *Lampetra japonica*. *Genesis*. 30, 51-58.
- Ohnuma, S., Harris, W.A. (2003). Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron*. 40(2), 199-208. Review.
- Okamoto, K., Nakatsukasa, M., Alié, A., Masuda, Y., Agata, K., Funayama, N. (2012). The active stem cell specific expression of sponge Musashi homolog EflMsiA suggests its involvement in maintaining the stem cell state. *Mech Dev*. 129(1-4), 24-37.
- Okano, H., Imai, T. and Okabe, M. (2002). Musashi: a translational regulator of cell fate. *J Cell Sci*. 115, 1355-1359.
- Okano, H., Kawahara, H., Toriya, M., Nakao, K., Shibata, S., Imai, T. (2005). Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells. *Exp. Cell Res*. 306, 349-356.

- Okano, H.J., Darnell, R.B. (1997). A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons. *J Neurosci.* 17, 3024-3037.
- Osborne, P.W., Benoit, G., Laudet, V., Schubert, M., Ferrier, D.E. (2009). Differential regulation of ParaHox genes by retinoic acid in the invertebrate chordate amphioxus (*Branchiostoma floridae*). *Dev Biol.* 327(1), 252-262.
- Pantin, C.F. (1952). The elementary nervous system. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 140, 147-168.
- Park, H., Hong, S., Kim, H., Kim, S., Yoon, E., Kim, C., Miki, N., Huh, T. (2000). Structural comparison of zebrafish Elav/Hu and their differential expression during neurogenesis. *Neuroscience Letters.* 279, 81-84.
- Pascale, A., Amadio, M., and Quattrone, A. (2008). Defining a neuron: neuronal ELAV proteins. *Cell Mol Life Sci.* 65, 128-140.
- Passamaneck, Y.J., Furchheim, N., Hejnol, A., Martindale, M.Q., Lüter, C. (2011). Ciliary photoreceptors in the cerebral eyes of a protostome larva. *Evodevo.* 1, 2-6.
- Paternolli, C., Neebe, M., Stura, E., Barbieri, F., Ghisellini, P., Hampp, N., Nicolini, C. (2009). Photoreversibility and photostability in films of octopus rhodopsin isolated from octopus photoreceptor membranes. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 88, 947-951.
- Pera, E.M., Kessel, M. (1998). Demarcation of ventral territories by the homeobox gene NKX2.1 during early chick development. *Dev Genes Evol.* 208, 168-171.
- Perron, M., Furrer, M., Wegnez, M., Théodore, L. (1999). *Xenopus* elav-like genes are differentially expressed during neurogenesis. *Mechanisms of Development.* 84, 139-142.
- Pichon, D., Gaia, V., Norman, M.D., Boucher-Rodoni, R. (2005). Phylogenetic diversity of epibiotic bacteria in the accessory nidamental glands of squids. *Marine Biology.* 147, 1323-1332.
- Plouhinec, J.L., Leconte, L., Sauka-Spengler, T., Bovolenta, P., Mazan, S., Saule, S. (2005). Comparative analysis of gnathostome Otx gene expression patterns in the developing eye: implications for the functional evolution of the multigene family. *Dev. Biol.* 278, 560-575.
- Pozzoli, O., Bosetti, A., Croci, L., Consalez, G.G., Vetter, M.L. (2001). Xebf3 is a regulator of neuronal differentiation during primary neurogenesis in *Xenopus*. *Dev Biol.* 233, 495-512.
- Prince, V.E., Moens, C.B., Kimmel, C.B., Ho, R.K. (1998). Zebrafish hox genes: expression in the hindbrain region of wild-type and mutants of the segmentation gene, *valentino*. *Development.* 125, 393-406.
- Raji, B., Dansault, A., Leemput, J., de la Houssaye, G., Vieira, V., Kobetz, A., Arbogast, L., Masson, C., Menasche, M., Abitbol, M. (2007). The RNA-binding protein Musashi-1 is produced in the developing and adult mouse eye. *Mol Vis.* 13, 1412-1427.
- Ramos, C., Robert, B. (2005). *msh/Msx* gene family in neural development. *Trends Genet.* 21(11), 624-632.

- Ranade, S.S., Yang-Zhou, D., Kong, S.W., McDonald, E.C., Cook, T.A., Pignoni, F. (2008). Analysis of the Otd-dependent transcriptome supports the evolutionary conservation of CRX/OTX/OTD functions in flies and vertebrates. *Dev. Biol.* 315, 521-534.
- Ratti, A., Fallini, C., Cova, L., Fantozzi, R., Calzarossa, C., Zennaro, E., Pascale, A., Quattrone, A., and Silani, V. (2006). A role for the ELAV RNA-binding proteins in neural stem cells: stabilization of Msi1 mRNA. *J Cell Sci.* 119, 1442-1452.
- Raven, C.P. (1966). *Morphogenesis: the analysis of molluscan development.* Oxford: Pergamon Press.
- Reichert, H., Simeone, A. (2001). Developmental genetic evidence for a monophyletic origin of the bilaterian brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 356, 1533-1544.
- Rentsch, F., Anton, R., Saina, M., Hammerschmidt, M., Holstein, T.W., and Technau, U. (2006). Asymmetric expression of the BMP antagonists chordin and gremlin in the sea anemone *Nematostella vectensis*: implications for the evolution of axial patterning. *Dev Biol.* 296, 375-387.
- Richard, A. (1970). Sexual differentiation of Cephalopoda in culture in vitro. *Annee Biol.* 9(7), 409-415.
- Richter, K., Good, P.J., Dawid, I.B. (1990). A developmentally regulated, nervous system-specific gene in *Xenopus* encodes a putative RNA-binding protein. *New Biol.* 2 (6).
- Richter, S., Loesel, R., Purschke, G., Schmidt-Rhaesa, A., Scholtz, G., Stach T., Vogt, L., Wanninger, A., Brenneis, G., Döring, C., Faller, S., Fritsch, M., Grobe, P., Heuer, C.M., Kaul, S., Møller, O.S., Müller, C.H., Rieger, V., Rothe, B.H., Stegner, M.E., Harzsch, S. (2010). Invertebrate neurophylogeny: suggested terms and definitions for a neuroanatomical glossary. *Front Zool.* 9, 7-29.
- Robinow, S., White, K. (1991). Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during *Drosophila melanogaster* development. *J Neurobiol.* 22, 443-461.
- Rodriguez, I., Hernandez, R., Modolell, J., Ruiz-Gomez, M. (1990). Competence to develop sensory organs is temporally and spatially regulated in *Drosophila* epidermal primordia. *Embo J.* 9, 3583-3592.
- Romagny, S., Darmaillacq, A.S., Guibé, M., Bellanger, C., Dickel, L. (2012). Feel, smell and see in an egg: emergence of perception and learning in an immature invertebrate, the cuttlefish embryo. *J Exp Biol.* 215, 4125-4130.
- Romani, S., Campuzano, S., Modolell, J. (1987). The achaete-scute complex is expressed in neurogenic regions of *Drosophila* embryos. *Embo J.* 6, 2085-2092.
- Romer, A.S. (1972). The vertebrate as a dual animal - somatic and visceral. *Evol. Biol.* 6, 121-156.
- Royer, J. (2002). *Modélisation des stocks de céphalopodes de Manche.* Thèse de 3ème cycle, Université de Caen. 242 pp.
- Russel, E.S. (1916). *Form and function: A contribution to the history of animal morphology.* John Murray, London (1917, American Edition, E.P. Dutton and Co, New York).

- Saina, M., Genikhovich, G., Renfer, E., and Technau, U. (2009). BMPs and chordin regulate patterning of the directive axis in a sea anemone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 18592-18597.
- Sakakibara, S., Imai, T., Hamaguchi, K., Okabe, M., Aruga, J., Nakajima, K., Yasutomi, Y., Nagata, T., Kurihara, Y., Uesugi, S., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Okano, H. (1996). Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev Biol*. 176, 230-242.
- Sakakibara, S., Okano, H. (1997). Expression of Neural RNA-Binding Proteins in the Postnatal CNS: Implications of Their Roles in Neuronal and Glial Cell Development. *The Journal of Neuroscience*. 17(21), 8300-8312.
- Samadi, L., Steiner, G. (2010). Conservation of ParaHox genes' function in patterning of the digestive tract of the marine gastropod *Gibbula varia*. *BMC Dev Biol*. 12, 10-74.
- Santagata, S., Resh, C., Hejnal, A., Martindale, M.Q., Passamanek, Y.J. (2012). Development of the larval anterior neurogenic domains of *Terebratalia transversa* (Brachiopoda) provides insights into the diversification of larval apical organs and the spiralian nervous system. *EvoDevo*. 24, 3.
- Sarker, M.M., Nesa, B., Jahan, M.S. (2007). Embryonic developmental ecology of freshwater snail *Lymnaea acuminata* (Lymnaeidae: Gastropoda). *Pak J Biol Sci*. 10(1), 23-31.
- Sasai, Y. (1994). *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell*. 79, 779-790.
- Sasai, Y. (2001). Roles of Sox factors in neural determination: conserved signaling in evolution? *The International journal of developmental biology*. 45, 321-326.
- Satoh, G., Wang, Y., Zhang, P., Satoh, N. (2001). Early development of amphioxus nervous system with special reference to segmental cell organization and putative sensory cell precursors: a study based on the expression of pan-neuronal marker gene *Hu/elav*. *J Exp Zool*. 291(4), 354-364.
- Schaeffel, F., Murphy, C.J., Howland, H.C. (1999). Accommodation in the cuttlefish (*Sepia officinalis*). *J Exp Biol*. 202(22), 3127-3134.
- Schirling, M., Bohlen, A., Triebkorn, R., Köhler, H.R. (2006). An invertebrate embryo test with the apple snail *Marisa cornuarietis* to assess effects of potential developmental and endocrine disruptors. *Chemosphere*. 64, 1730-1738.
- Schmidt, H., Rikert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J., Technau, G.M. (1997). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster* – II. neuroblast lineages derived from the dorsal half of the neuroectoderm. *Dev. Biol*. 189, 186-204.
- Schubert, M., Escriva, H., Laudet, V. (2004). La pensée à fleur de peau. *Relations industrielles*. 46(1), 242-244. *M/S : médecine sciences*. 20 (3), 273-274.
- Schwarz, M., Alvarez-Bolado, G., Dressler, G., Urbánek, P., Busslinger, M., Gruss, P. (1999). Pax2/5 and Pax6 subdivide the early neural tube into three domains. *Mech Dev*. 82(1-2), 29-39.

- Schwarz, M., Cecconi, F., Bernier, G., Andrejewski, N., Kammandel, B., Wagner, M., Gruss, P. (2000). Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6. *Development*. 127(20), 4325-4334.
- Seo, S., Lim, J.W., Yellajoshiyula, D., Chang, L. W., Kroll, K.L. (2007). Neurogenin and NeuroD direct transcriptional targets and their regulatory enhancers. *Embo J*. 26, 5093- 5108.
- Shibata, S., Umei, M., Kawahara, H., Yano, M., Makino, S., Okano, H. (2012). Characterization of the RNA-binding protein Musashi1 in zebrafish. *Brain Res*. 1462, 162-173.
- 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.
- Shigeno, S., Sasaki, T., Moritaki, T., Kasugai, T., Vecchione, M., Agata, K. (2008). Evolution of the cephalopod head complex by assembly of multiple molluscan body parts: Evidence from *Nautilus* embryonic development. *J Morphol*. 269(1), 1-17.
- Shimamura, K., Hartigan, D.J., Martinez, S., Puelles, L., Rubenstein, J.L. (1995). Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development*. 121(12), 3923-3933. Review.
- Siddall, N.A., McLaughlin, E.A., Marriner, N.L., Hime, G.R. (2006). The RNA-binding protein Musashi is required intrinsically to maintain stem cell identity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 8402-8407.
- Siddall, N.A., Kalcina, M., Johanson, T.M., Monk, A.C., Casagrande, F., Been, R.P., McLaughlin, E.A., Hime, G.R. (2012). *Drosophila* Rbp6 is an orthologue of vertebrate Msi-1 and Msi-2, but does not function redundantly with dMsi to regulate germline stem cell behaviour. *PLoS One*. 7(11), 49810.
- Simeone, A. (1998). Otx1 and Otx2 in the development and evolution of the mammalian brain. *EMBO J*. 17, 6970-6978.
- Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A., Boncinelli, E. (1992a). Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature*. 358, 687-690.
- Simionato, E., Kerner, P., Dray, N., Le Gouar, M., Ledent, V., Arendt, D., Vervoort, M. (2008). atonal- and achaete-scute-related genes in the annelid *Platynereis dumerilii*: insights into the evolution of neural basic-Helix-Loop-Helix genes. *BMC Evol Biol*. 8, 170.
- Simpson, P. (1997). Notch signalling in development: on equivalence groups and asymmetric developmental potential. *Current opinion in genetics & development*. 7, 537-542.
- Simpson, P., Carteret, C. (1990). Proneural clusters: equivalence groups in the epithelium of *Drosophila*. *Development*. 110, 927-32.
- Skeath, J.B., Thor, S. (2003). Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Curr Opin Neurobiol*. 13, 8-15.
- Small, E.M., Vokes, S.A., Garriock, R.J., Li, D., Krieg, P.A. (2000). Developmental expression of the *Xenopus* Nkx2-1 and Nkx2-4 genes. *Mechanisms of Development*. 96, 259-262.

- Smith, S.A., Wilson, N.G., Goetz, F.E., Feehery, C., Andrade, S.C., Rouse, G.W., Giribet, G., Dunn, C.W. (2011). Resolving the evolutionary relationships of molluscs with phylogenomic tools. *Nature*. 480(7377), 364-367.
- Smith, W.C., Harland, R.M. (1992). Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell*. 70, 829-40.
- Steiner, G., Dreyer, H. (2002). Molecular phylogeny of Scaphopoda (Mollusca) inferred from 18S rDNA sequences: support for a Scaphopoda–Cephalopoda clade. *The Norwegian Academy of Science and Letters, Zoologica Scripta*. 32, 343-356.
- Steinmetz, P.R., Urbach, R., Posnien, N., Eriksson, J., Kostyuchenko, R.P., Brena, C., Guy, K., Akam, M., Bucher, G., Arendt, D. (2010). Six3 demarcates the anterior-most developing brain region in bilaterian animals. *Evodevo*. 1, 14.
- Steinmetz, P.R., Kostyuchenko, R.P., Fischer, A., Arendt, D. (2011). The segmental pattern of *otx*, *gbx*, and *Hox* genes in the annelid *Platynereis dumerilii*. *Evol. Dev.* 13, 72-79.
- Stollewerk, A., Weller, M., Tautz, D. (2001). Neurogenesis in the spider *Cupiennius salei*. *Development*. 128, 2673-2688.
- Stollewerk, A. (2002). Recruitment of cell groups through Delta/Notch signalling during spider neurogenesis. *Development*. 129, 5339-5348.
- Stornaiuolo, A., Bayascas, J.R., Salò, E., Boncinelli, E. (1998). A homeobox gene of the orthodenticle family is involved in antero-posterior patterning of regenerating planarians. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 1153-1158.
- Sundermann, G. (1983). The fine structure of epidermal lines on arms and head of postembryonic *Sepia officinalis* and *Loligo vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda). *Cell Tissue Res.* 232(3), 669-677.
- Sutherland, J.M., McLaughlin, E.A., Hime, G.R., Siddall, N.A. (2013). The musashi family of RNA binding proteins: master regulators of multiple stem cell populations. *Adv Exp Med Biol.* 786, 233-245.
- Suzuki, T., Saigo, K. (2000). Transcriptional regulation of *atonal* required for *Drosophila* larval eye development by concerted action of *eyes absent*, *sine oculis* and hedgehog signaling independent of fused kinase and *cubitus interruptus*. *Development*. 127(7), 1531-1540.
- Sweeney, M.J., Roper, C.F.E., Mangold, K.M., Clarke, M.R., Boletzky, S.V. (1992). 'Larval' and juvenile cephalopods: a manual for their identification. *Smithsonian Contributions to Zoology - No. 513*.
- Takacs, C.M., Amore, G., Oliveri, P., Poustka, A.J., Wang, D., Burke, R.D., Peterson, K.J. (2004). Expression of an NK2 homeodomain gene in the apical ectoderm defines a new territory in the early sea urchin embryo. *Dev Biol.* 269(1), 152-164.
- Takacs, C.M., Moy, V.N., Peterson, K.J. (2002). Testing putative hemichordate homologues of the chordate dorsal nervous system and endostyle: expression of NK2.1 (TTF-1) in the acorn worm *Ptychodera flava* (Hemichordata, Ptychoderidae). *Evol Dev.* 4(6), 405-417.
- Takebayashi, K., Takahashi, S., Yokota, C., Tsuda, T., Nakanishi, S., Asashima, M., Kageyama, R. (1997). Conversion of ectoderm into a neural fate by *ATH-3*, a vertebrate basic

- helix-loop-helix gene homologous to *Drosophila* proneural gene *atonal*. *EMBO J.* 16(2), 384-395.
- Tessmar-Raible, K. (2007). The evolution of neurosecretory centers in bilaterian forebrains: insights from protostomes. *Semin Cell Dev Biol.* 18, 492-501.
- Thompson, J., Ziman, M. (2011). Pax genes during neural development and their potential role in neuroregeneration. *Progress in Neurobiology.* 95(3), 334-351.
- Tomarev, S.I., Callaerts, P., Kos, L., Zinovieva, R., Halder, G., Gehring, W., Piatigorsky, J. (1997). Squid Pax-6 and eye development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 2421-2426.
- Umesono, Y., Watanabe, K., Agata, K. (1999). Distinct structural domains in the planarian brain defined by the expression of evolutionarily conserved homeobox genes. *Dev. Genes Evol.* 209, 31-39.
- Ungerer, P., Scholtz, G. (2008). Filling the gap between identified neuroblasts and neurons in crustaceans adds new support for Tetraconata. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society.* 275, 369-376.
- Ungerer, P., Eriksson, B.J., Stollewerk, A. (2011). Neurogenesis in the water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Branchiopoda) suggests different mechanisms of neuroblast formation in insects and crustaceans. *Dev Biol.* 357, 42-52.
- Urbach, R. (2007). A procephalic territory in *Drosophila* exhibiting similarities and dissimilarities compared to the vertebrate midbrain/hindbrain boundary region *Neural Develop.* 2, 23.
- van der Zee, M., Stockhammer, O., von Levetzow, C., Nunes da Fonseca, R., Roth, S. (2006). Sog/Chordin is required for ventral-to-dorsal Dpp/BMP transport and head formation in a short germ insect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 16307-16312.
- Vandendries, E.R., Johnson, D., Reinke, R. (1996). Orthodenticle is required for photoreceptor cell development in the *Drosophila* eye. *Dev. Biol.* 173, 243-255.
- Viczian, A.S., Vignali, R., Zuber, M.E., Barsacchi, G., Harris, W.A. (2003). XOtx5b and XOtx2 regulate photoreceptor and bipolar fates in the *Xenopus* retina. *Development.* 130, 1281-1294.
- von Ohlen, T., and Doe, C.Q. (2000). Convergence of dorsal, dpp, and egfr signaling pathways subdivides the *drosophila* neuroectoderm into three dorsal-ventral columns. *Dev Biol.* 224, 362-372.
- Vopalensky, P., Kozmik, Z. (2009). Eye evolution: common use and independent recruitment of genetic components. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 364, 2819–2832. Review.
- Vorobyov, E., Horst, J. (2006). Getting the proto-Pax by the tail. *J Mol Evol.* 63(2), 153-164.
- Voronezhskaya, E.E., Tyurin, S.A., Nezlin, L.P. (2002). Neuronal development in larval chiton *Ischnochiton hakodadensis* (Mollusca: Polyplacophora). *J. Comp. Neurol.* 444, 25-38.
- Wagner, G.P. (2007). The developmental genetics of homology. *Nature Rev. Genet.* 8, 473-479
- Wakamatsu, Y., Weston, J.A. (1997). Sequential expression and role of Hu RNA-binding proteins during neurogenesis. *Development.* 124, 3449-3460.

- Walther, C., Guenet, J.L., Simon, D., Deutsch, U., Jostes, B., Goulding, M.D., Plachov, D., Balling, R., Gruss, P. (1991). Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes. *Genomics*. 11(2), 424-434.
- Wang, Y., Jones, F.S., Krushel, L.A., Edelman, G.M. (1996). Embryonic expression patterns of the neural cell adhesion molecule gene are regulated by homeodomain binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(5), 1892-1896.
- Wanninger, A. (2008). Comparative lophotrochozoan neurogenesis and larval neuroanatomy: recent advances from previously neglected taxa. *Acta Biol Hung*. 59 (suppl), 127-136.
- Weiss, J.B., Von Ohlen, T., Mellerick, D.M., Dressler, G., Doe, C.Q., Scott, M.P. (1998). Dorsoventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the intermediate neuroblasts defective homeobox gene specifies intermediate column identity. *Genes Dev*. 12, 3591-3602.
- Wells, M.J. (1962). *Brain and Behavior in Cephalopods*. Stanford University Press, Stanford.
- Westley, C.B., Benkendorff, K., McIver, C.M., Le Leu, R.K., Abbott, C.A. (2013). Gastrointestinal and hepatotoxicity assessment of an anticancer extract from muricid molluscs. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013, 837370.
- Weyrer, S., Rützler, K., Rieger, R. (1999). Serotonin in Porifera? Evidence from developing *Tedania ignis*, the Caribbean fire sponge (Demospongiae). *Mem Queensl Mus*. 44, 659-665.
- Wheeler, S.R., Carrico, M.L., Wilson, B.A., Skeath, J.B. (2005). The *Tribolium* columnar genes reveal conservation and plasticity in neural precursor patterning along the embryonic dorsal-ventral axis. *Dev. Biol*. 279, 491-500.
- Wiellette, E.L., Sive, H. (2003). *vhnf1* and *Fgf* signals synergize to specify rhombomere identity in the zebrafish hindbrain. *Development*. 130, 3821-3829.
- Williamson, R. (1991). The response of the sensory hair cells in the statocyst of *Sepia*. In *The Cuttlefish* (Ed. E. Boucaud-Camou), pp. 211-221. Caen: Centre de Publications de l'Université de Caen.
- Wilson, J.M., Sato, K., Chernoff, E.A., Belecky-Adams, T.L. (2007). Expression patterns of chick *Musashi-1* in the developing nervous system. *Gene Expr Patterns*. 7(7), 817-825.
- Wollesen, T., Cummins, S.F., Degnan, B.M., Wanninger, A. (2010a). *FMRFamide* gene and peptide expression during central nervous system development of the cephalopod mollusk, *Idiosepius notoides*. *Evol Dev*. 12, 113-130.
- Wollesen, T., Degnan, B.M., Wanninger, A. (2010b). Expression of serotonin (5-HT) during CNS development of the cephalopod mollusk, *Idiosepius notoides*. *Cell Tissue Res*. 342, 161-178.
- Wollesen, T., Sukhsangchan, C., Seixas, P., Nabhitabhata, J., Wanninger, A. (2012). Analysis of neurotransmitter distribution in brain development of benthic and pelagic octopod cephalopods. *J Morphol*. 273, 776-790.
- Woodhams, P.L., Messenger J.B. (1974). A note on the ultrastructure of the octopus olfactory organ. *Cell and Tissue Research*. 152, 253-258.

- Yamaguchi, T. P. (2001). Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Curr Biol.* 11, 713-724.
- Yamamoto, M., Shimazaki, Y., Shigeno, S. (2003). Atlas of the embryonic brain in the pygmy squid, *Idiosepius paradoxus*. *Zool Sci.* 20, 163-179.
- Yi, B., Bumbarger, D., Sommer, R.J. (2009). Genetic evidence for pax-3 function in myogenesis in the nematode *Pristionchus pacificus*. *Evol Dev.* 11(6), 669-679.
- Yim, S.J., Lee, Y.S., Lee, J.A., Chang, D.J., Han, J.H., Kim, H., Park, H., Jun, H., Kim, V.N., Kaang, B.K. (2006). Regulation of ApC/EBP mRNA by the *Aplysia* AU-rich element-binding protein, ApE-LAV, and its effects on 5-hydroxytryptamine-induced long-term facilitation. *J Neurochem.* 98, 420-429.
- 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.
- Young, J.Z. (1939). Fused neurones and synaptic contacts in the giant nerve fibers of Cephalopod. *Philos Trans R Soc Lond B.* 229, 465-503.
- Young, J.Z. (1963). Some essentials of neural memory systems. Paired centres that regulate and address the signals of the results of action. *Nature.* 198, 626-630.
- Young, J.Z. (1971). The anatomy of the nervous system of *Octopus vulgaris*. Clarendon press, Oxford.
- Young, J.Z. (1991). Computation in the Learning System of Cephalopods. *Bid. Bull.* 180, 200-208.
- Young, R.E., Harman, R.F. (1988). "Larva", "Paralarva", and "Subadult" in Cephalopod Terminology". *Malacologia.* 29(1), 201-207.
- Yu, J.K., Satou, Y., Holland, N.D., Shin, I.T., Kohara, Y., Satoh, N., Bronner-Fraser, M., and Holland, L.Z. (2007). Axial patterning in cephalochordates and the evolution of the organizer. *Nature* 445, 613-617.
- Zaffran, S., Das, G., and Frasch, M. (2000). The NK-2 homeobox gene scarecrow (*scro*) is expressed in pharynx, ventral nerve cord and brain of *Drosophila* embryos. *Mechanisms of Development.* 94, 237-241.
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, .Y, Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C.E., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature.* 490(7418), 49-54.

Approche Evo-Dévo de la différenciation et de la régionalisation du système nerveux chez la seiche *Sepia officinalis*

Au sein des Mollusques, les Céphalopodes se distinguent par leurs capacités cognitives. Leur cerveau, issu de ganglions condensés, se met en place *via* un développement direct et leur système nerveux ne s'organise pas en un cordon nerveux le long d'axes antéro-postérieur et médio-latéral clairs, contrairement aux organismes les plus communément étudiés (*Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, et plus récemment *Platynereis dumerilii*). L'étude de l'expression de gènes connus pour être impliqués dans les processus de régionalisation (*Otx*, *Pax*, *Nk*, *Gsx*) et de différenciation neurale (*Elav*, *Musashi*) a été conduite chez *Sepia officinalis*. Les résultats ont permis : 1) d'établir la dynamique de maturation des ganglions, et de montrer en particulier une maturation tardive des lobes impliqués dans l'apprentissage et la mémoire ; 2) de proposer une cartographie des territoires embryonnaires, basée pour la première fois sur des données moléculaires, ce qui apporte un regard nouveau sur l'organogenèse des céphalopodes ; 3) de mettre en évidence des rôles nouveaux de ces gènes de spécification et de différenciation neurale dans la mise en place des synapomorphies des céphalopodes (bras, entonnoir, yeux camérulaires) ; 4) de montrer que malgré les caractères dérivés de leur embryogenèse et de leur système nerveux, certains des gènes de spécification présentent une expression régionalisée similaire à celle observée dans l'axe nerveux médian des espèces modèles. Ces résultats soulignent l'intérêt de prendre en compte les relations évolutives entre les fonctions de gènes et les organisations des systèmes nerveux dans différentes familles de métazoaires.

Mots clés : *Sepia officinalis*, céphalopode, mollusque, neurogenèse, Evo-Dévo, plans d'organisations.

Evo-Devo approach of the nervous system differentiation and regionalization in the cuttlefish *Sepia officinalis*

Among Molluscs, Cephalopods are remarkable by their cognitive abilities. Their brain, resulting from the condensation of some ganglia, set up through a direct development, and their nervous system is not organized as a nerve cord along clear anterior-posterior and medio-lateral axes, unlike most studied organisms (*Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, and more recently *Platynereis dumerilii*). The expression study of genes known to be involved in the neural regionalization (*Otx*, *Pax*, *Nk*, *Gsx*) and differentiation processes (*Elav*, *Musashi*) has been conducted in *Sepia officinalis*. The results enable us : 1) to establish the dynamics of ganglionic maturation, showing in particular a late maturation of the lobes involved in learning and memory; 2) to provide a map of embryonic territories, based for the first time on molecular data, which gives a new insight into the cephalopod organogenesis; 3) to highlight new roles for these genes in the neural differentiation and specification in the development of cephalopod synapomorphies (arms, funnel, camerular eyes); 4) to show that despite the derived features of the embryogenesis and nervous system in cephalopods, some genes of neural specification present a regionalized expression, similar to that is observed in the median nerve axis of the model species. These results emphasize the importance of taking into account the evolutionary relationships between gene functions and the various organizations of nervous systems in a wide range of metazoan phyla.

Key words: *Sepia officinalis*, cephalopod, mollusc, neurogenesis, Evo-Devo, body axes.

