

THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Diversité du vivant
(Ecole Doctorale 392)

Présentée par

Sandra NAVET

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

**EVO-DEVO du système neuro-musculaire impliqué
dans la locomotion chez la seiche *Sepia officinalis***

Soutenue le 30 septembre 2010

JURY

Mme. Véronique Borday-Birraux,
MCU, HDR, Université Paris Diderot Paris 7

Rapporteure

Mme. Céline Zatylny-Gaudin
MCU HDR, Université de Caen Basse-Normandie

Rapporteure

M. Yann Bassaglia
MCU, Paris Université de Créteil Val-de-Marne

Examineur

M. Hervé Le Guyader
PR, UPMC, Paris 6

Examineur

M. Joël Henry
MCU, HDR, Université de Caen Basse-Normandie

Examineur

Mme Laure Bonnaud
MCU, HDR, Université Paris Diderot Paris 7

Directrice de thèse

Remerciements

C'est au Muséum National d'Histoire Naturelle que j'ai pu réaliser mes recherches durant ces trois dernières années. Je remercie tout le personnel de m'avoir accueillie et de m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions.

Je remercie le Professeur Guy Duhamel de m'avoir reçue au sein du Département des Milieux et Peuplements Aquatiques afin d'y réaliser d'abord mon stage de Master 2 puis de poursuivre en thèse.

J'exprime toute ma gratitude à Elisabeth Badinter, Alain Bougrain-Dubourg, Anne de la Baume, Béatrice Netter-Leval et Nathalie Royer de la Fondation pour la Vocation Marcel Bleustein-Blanchet pour m'avoir accordé leur confiance et leur soutien et m'avoir ainsi permis de poursuivre ma thèse dans les meilleures conditions.

Durant un an et demi, j'ai pu travailler sous contrat avec l'Agence Nationale de la Recherche. Je remercie infiniment les responsables pour m'avoir offer cette opportunité professionnelle.

Merci de tout coeur à Sylvie Dufour pour son accueil chaleureux dans l'UMR BOREA, ses précieux conseils lors des « points manip' » de l'équipe et sa passion communicative pour la recherche.

J'exprime mon amitié respectueuse et ma profonde gratitude à Madame Laure Bonnaud auprès de qui j'ai beaucoup appris, dans le domaine scientifique comme sur le plan humain. Son soutien et ses encouragements ont nourri ma motivation tout au long de ces trois années et demie passées au sein de son laboratoire. Travailler avec elle qui a manifesté tant d'enthousiasme devant les résultats de ma recherche fut pour moi une expérience exaltante et un réel plaisir.

J'adresse mes vifs remerciements aux membres du jury, Madame Véronique Borday-Birraud et Madame Céline Zlatylny-Gaudin qui ont accepté d'être les rapporteuses de mon travail en cette période estivale ainsi que Messieurs Joël Henry, Yann Bassaglia et Hervé le Guyader qui m'ont fait l'honneur de participer à mon jury de thèse et d'évaluer mon travail.

Je remercie Thomas Lacoué-Labarthe, Morgane Nedelec, Sébastien Henry, Pierre Moriniere et Nicolas Bierne pour leur gentillesse et pour nous avoir procuré de nombreux oeufs de seiche.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe « neurogenèse des Céphalopodes » pour les points « 3C » allant même jusqu'à « 5C », les pic-nic et les gouters, studieux bien sûr, et toujours à visée scientifique : Aude qui m'a formée à de nombreuses manipulations et m'a montré que la gestion d'un laboratoire était loin d'être de tout repos et à Sébastien pour ses réflexions scientifiques toujours si pertinentes et pour avoir partagé avec moi ses références télévisuelles d'enfance... Merci à Yann pour sa gentillesse et sa précieuse

contribution pour l'aspect « musculaire » de mon travail et à Madeleine pour son aide importante en ce qui concerne les coupes au cryostat, son expertise en confection de tampons et surtout, sa constante bienveillance à mon égard. Enfin, je remercie Salima pour sa bonne humeur éternelle et ses goûts musicaux certains, ces airs qui n'ont pas fini de me trotter dans la tête...

Merci à toute l'équipe du 7 rue Cuvier : Karine, Sylvie, Françoise, Cécile, Gersende, Anne-Gaëlle et Jérémy pour avoir partagé leur travail et leurs talents culinaires au cours de nos « points manip' » réguliers. Leurs remarques et conseils m'ont été d'une grande utilité.

Je tiens aussi à remercier tous les stagiaires qui sont passés dans l'équipe : Narimane, Alexandre, Erwan, Léna, Alice, Leslie, Auxane, Angélique et Arthur. Merci d'avoir fait preuve de patience quand je n'étais pas claire dans mes explications, de m'avoir fait partager votre passion pour la biologie et d'avoir ainsi agi comme des « boosters » pour ma recherche.

Merci à tous mes ami(e)s : Hélène, Ludo, Marianne, Nico, Naharisoa, Paul, Michaël et Colette pour avoir pensé à moi à chaque vision d'un Céphalopode, pour avoir compris qu'une seiche n'était pas un calmar et encore moins une pieuvre et pour leur encouragements jusqu'au bout du chemin de la thèse...

Je remercie mon petit fiancé Nico, mon plus proche soutien pendant toute cette période, son appui indéfectible et nos discussions scientifiques m'ont aidée à reprendre le dessus toutes les fois où les choses devenaient pesantes.

Je ne saurais oublier mes parents qui ont toujours montré beaucoup d'intérêt pour mon travail et m'ont soutenue dans toutes mes entreprises.

Liste des publications et communications réalisées pendant la formation doctorale

Articles publiés

Navet S, Bassaglia Y, Baratte S, Martin M, Bonnaud L, 2008. Somatic muscle development in *Sepia officinalis* (Cephalopoda - Mollusca): a new role for *NK4*. *Developmental Dynamics* 237, 1944-1951.

Navet S, Andouche A, Baratte S, Bonnaud, L, 2009. *Shh* and *Pax-6* have unconventional expression patterns in embryonic morphogenesis in *Sepia officinalis* (Cephalopoda). *Gene Expression Patterns* 9, 461-467.

Navet S, Bassaglia Y, Baratte S, Andouche A, Bonnaud, L, 2010. Shell reduction and locomotory development in cephalopods: the recruitment of *engrailed* and *NK4* genes in *Sepia officinalis*. *Ferrantia* 59, 156-164.

Article en préparation

Navet S & Bonnaud L, *Pax2/5/8* roles have been extended in mesodermal tissues involved in locomotion in *Sepia officinalis* (Cephalopoda - Mollusca).

Communications orales

Navet S, Bassaglia Y, Bonnaud L, 2008. *Engrailed* and *NK4* in cephalopods : homeobox genes implicated in the emergence of morphological novelties. Coleoid 3rd International Symposium, Luxembourg, Luxembourg. Abstract book p.79.

Aroua S, Andouche A, Martin M, **Navet S**, Bonnaud L, 2009. FMRamide expression during embryogenesis in the cuttlefish *Sepia officinalis*. Cephalopod International Advisory Council Symposium, Vigo, Espagne. Abstract book p.36, oral communication n°40.

Navet S, Andouche A, Baratte S, Bonnaud, L, 2009. A putative role of *Shh* in the setting up of bilaterality in *Sepia officinalis*. Cephalopod International Advisory Council Symposium, Vigo, Spain. Abstract book p.39, oral communication n°47.

Communications affichées

Baratte S, **Navet S**, Andouche A, Bonnaud L, 2007. Studying neurogenesis in cephalopods, why and how ? 5th European Conference of Comparative Neurobiology, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France.

Navet S, Baratte S, Bassaglia Y, Andouche A, Bonnaud L, 2010. Cephalopods as a new model to enlighten the evolution of Lophotrochozoans. 3rd European Conference of Evolutionary Developmental Biology (Euro-Evo-Devo), Paris 7, France.

Communications vidéo

Navet S, Knittl N, 2008. Sepia City. Festival de Très Courts-Métrages de Vulgarisation Scientifique Ile-de-France « Les chercheurs font leur cinéma », Prix du Jury.

« La seiche a le parfum exquis, l'ambre gris, qu'on ne trouve dans la baleine que comme résidu des seiches en nombre infini qu'elle absorbe. [...] Toutes les nuances de l'iris la plus variée se succèdent et se fondent sur sa peau transparente selon le jeu de la lumière, le mouvement de la respiration. Mourante, elle vous regarde encore de son œil d'azur et trahit les dernières émotions de la vie par des lueurs fugitives qui montent du fond à la surface, apparaissent par moment pour disparaître aussitôt. »

(Jules Michelet, *La mer*, Lausanne, L'Âge d'Homme, 1980 [1861], p. 119).

Les Nootka (Amérindiens de la côte occidentale du Canada) racontent :

« Jadis, les quadrupèdes et les poissons rendirent visite au Vent du sud. Ils le trouvèrent endormi et voulurent l'effrayer. La Seiche se cacha sous le lit, le Flet et la Raie s'allongèrent au pied, et la Souris mordit le nez du dormeur. Celui-ci s'éveilla en sursaut ; en se levant, il glissa sur les deux poissons plats et tomba. La Seiche noua ses tentacules autour des jambes du Vent. Rendu furieux, il se mit à souffler avec une telle violence qu'il transpira, et les gouttes ruisselant de son front formèrent la pluie. Il réussit enfin à chasser ses ennemis, mais, par rancune, il revint de temps en temps sur terre pour les tourmenter, car les quadrupèdes souffrent des tempêtes de pluie et, quand la mer est grosse, elle rejette les poissons sur les grèves où ils périssent nombreux. »

(Claude Lévi-Strauss, *Mythologiques 4. L'homme nu*, Paris, Plon, 1971, pp. 487-488).

Table des matières

Remerciements	3
Liste des publications	5
Introduction	13
1. La seiche : un nouveau modèle Evo-Dévo	25
1.1. Classification	25
1.2. Cycle de vie	25
1.3. Embryogenèse	30
2. La locomotion, fonction essentielle dépendante du système neuro-musculaire	43
2.1. La locomotion	43
2.2. Le système nerveux	45
2.2.1. <i>Le développement du système nerveux</i>	45
2.2.2. <i>Le système nerveux central</i>	49
2.2.2.1. Le cerveau	53
2.2.2.2. Les lobes optiques et tissus associés	58
2.2.2.3. Rapport des différents lobes juvéniles/adultes	61
2.2.3. <i>Le système nerveux périphérique</i>	62
2.2.3.1. Le système nerveux brachial	63
2.2.3.2. Les ganglions stellaires et le système de fibres géantes	63
2.2.3.3. Les statocystes	64
2.2.3.4. Autres structures notables appartenant au système nerveux périphérique	65
2.2.3.5. Les chromatophores	66
2.3. Le système musculaire	67
3. Gènes d'intérêt	73
3.1. La voie <i>sonic hedgehog</i>	73
3.2. Les gènes <i>NK</i>	79
3.2.1. <i>NK2 et NK6</i>	
3.2.2. <i>NK4</i>	
3.3. Les gènes <i>Pax</i>	
3.3.1. <i>Pax6</i>	
3.3.2. <i>Pax2/5/8</i>	
3.3.3. <i>Pax3/7</i>	
3.4. <i>Nodal</i>	
Matériel et méthodes	
1. Matériel biologique	
2. Extraction d'ADN	
3. Extraction d'ARN	
4. Amplification des acides nucléiques	
4.1. Transcription inverse	
4.2. PCR (Polymerase Chain reaction)	
4.3. Banque d'ESTs	
5. Clonage et séquençage	
6. Synthèse d'une sonde	

7. Hybridation *in situ*

8. Coupes

9. Approches fonctionnelles

9.1 Traitements à la cyclophamide

9.2 Traitement au SB 431542

9.3 Mise en place d'un protocole d'injection

I. Contrôle moléculaire de la mise en place du complexe neuro-musculaire chez les Céphalopodes. Implications évolutives sur la fonction de locomotion.

1. Les structures musculaires chez la seiche, innovations morphologiques et particularités histologiques

2. Contexte de l'étude de la myogenèse chez les Céphalopodes

3. *NK4*, un recrutement dans les muscles locomoteurs

4. *Pax2/5/8*, des rôles conservés et étendus à la mise en place de tissus mésodermiques

5. *Pax2/5/8* et *NK4*, une complémentarité dans la mise en place de structures à destinée locomotrice

5.1. La mise en place des bras, une collaboration de plusieurs gènes

5.2. Le manteau et le sac coquillier

5.3. L'entonnoir, quand les gènes appuient les différences d'origine entre les poche et tube

6. *Pax3/7*, un troisième gène impliqué dans les structures musculaires ?

7. *Paxβ*, grand absent chez les Céphalopodes ?

Article : "Somatic muscle development in *Sepia officinalis* (Cephalopoda-Mollusca): a new role for *NK4*".

Article : "Shell reduction and locomotory development in cephalopods: the recruitment of *engrailed* and *NK4* genes in *Sepia officinalis*".

II. Système contrôle de la locomotion, comment se met en place le système nerveux ?

1. *Pax6* et *Shh*, des gènes impliqués dans la formation du système nerveux central et périphérique

1.1. La mise en place des ganglions, une coopération entre *Pax6* et *shh*

1.2. *Shh* et *Pax6* participent tous les deux à l'organogenèse des bras

1.3. *Shh* et *Pax6* sont impliqués dans la formation d'organes sensoriels

2. Les plans du corps, quelle(s) implication(s) pour *Pax6* et *shh* ?

2.1. L'orientation dorso-ventrale, quels rôles pour *Pax6* et *shh* ?

2.2. *Shh* semble être impliqué dans la mise en place de la bilatéralité chez *S. officinalis*

2.2.1. *Shh* s'exprime le long de l'axe de symétrie bilatérale pendant le développement de *S. officinalis*

2.2.2. L'inactivation de la voie *shh* entraîne malformations et asymétries

2.3. Nodal, un autre facteur clé pendant l'embryogenèse de *S. officinalis*

Article: "*Shh* and *Pax-6* have unconventional expression patterns in embryonic morphogenesis in *Sepia officinalis* (Cephalopoda)".

III. Évolution des familles de gènes

1. La famille Pax

1.1. *PaxB*, à l'origine des gènes *Pax2/5/8* et *Pax6*

1.2. *Pax 2/5/8*

1.2.1. Rôle ancestral de *PAX2/5/8*

1.2.2. *PAX2/5/8* et *engrailed*, un lien moléculaire conservé ?

1.2.3. *Pax3/7*, une interchangeabilité possible avec *Pax2/5/8* ?

2. La famille NK

2.1. Origine du cluster NK

2.2. Les gènes NK2

2.3. NK4

3. Shh

Conclusion et perspectives

Annexes

Annexe 1 : Table de développement embryonnaire de *Sepia Officinalis L.*
(Mollusque Céphalopode) Lemaire, 1970

Annexe 2 : Alignements nucléotidiques et protéiques des gènes caractérisés dans cette étude chez *Sepia officinalis*

Annexe 3 : Protocole d'extraction d'ADN

Annexe 4 : Protocole d'extraction d'ARN

Annexe 5 : Carte du plasmide pCR® 4-TOPO® (Invitrogen) utilisé lors des clonages de séquences PCR

Annexe 6 : Protocole de synthèse de sonde

Annexe 7 : Solutions utilisées pour les HIS *in toto*

Annexe 8 : Protocole d'HIS *in toto*

Bibliographie

INTRODUCTION

Outre que les Céphalopodes ont inspiré dès l'antiquité les artistes, comme en témoignent les amphores, pièces de monnaie, céramiques, mosaïques et autres vestiges de cette époque, le philosophe Aristote (330 avant notre ère) avait pointé les facultés extraordinaires de ces animaux. Les Céphalopodes ont aussi toujours été synonymes de terreur. Aristote prétendait que, prise avec une pieuvre dans un même filet, la langouste pouvait mourir de frayeur. Les croyances populaires ont rarement donné le « beau rôle » à ces animaux. En Grèce, on affirmait que les pieuvres pouvaient aller sur les terres pour voler de la nourriture aux habitants. Des rencontres de pêcheurs avec le calmar géant ont notamment inspiré le mythe du terrifiant Kraken de la mythologie scandinave. Malgré la crainte qu'ils inspiraient, les Céphalopodes ont toujours montré une intelligence hors du commun parmi les animaux aquatiques, que ce soit dans les contes et les légendes ou dans les croyances populaires.

La classe des Céphalopodes et leur attachement aux Mollusques n'ont été établis qu'à la fin du 18^{ème} siècle. Mais au 19^{ème} siècle, ils se sont trouvés au centre d'une controverse scientifique entre Etienne Geoffroy de Saint-Hilaire (1772-1844) et George Cuvier (1769-1832) sur la similitude de leur anatomie avec les Vertébrés (Le Guyader, 1998). D'un côté, Geoffroy de Saint-Hilaire, naturaliste, soutenait que ces deux groupes présentaient le même plan structural de base et que tous les animaux partageaient une organisation unique.

Il s'opposait alors au zoologiste George Cuvier (1769-1832) qui proposait un classement dans lequel il distinguait quatre plans d'organisation : celui des Vertébrés, celui des Mollusques, celui des « animaux articulés » et, enfin, celui des « animaux rayonnés ». Le désaccord entre les zoologistes s'étendait à l'évolution des espèces à laquelle croyait fermement Saint-Hilaire, tandis que Cuvier, lui, défendait la théorie fixiste. Dès cette époque, les Céphalopodes sont apparus comme un groupe clé, dont la ressemblance avérée avec les Vertébrés a servi d'argument, aujourd'hui maladroit, pour défendre l'hypothèse d'un ancêtre commun à toutes les espèces.

Les Céphalopodes ont souvent été comparés aux « poissons » téléostéens par leurs multiples ressemblances dues à leur milieu de vie aquatique. Packard (1972) observait notamment que les Téléostéens et les Céphalopodes montraient des adaptations similaires à la nage rapide. Les deux groupes présentent des corps fuselés permettant une meilleure pénétration dans l'eau, des nageoires et la possibilité de se déplacer par propulsion. Cependant, le mode de déplacement par propulsion est très minoritaire chez les Téléostéens, à la différence des Céphalopodes qui utilisent la musculature puissante de leur manteau et entonnoir afin de chasser brusquement l'eau accumulée dans la cavité du manteau, et ainsi, se déplacer rapidement à contre-courant. Quant aux nageoires, elles semblent indispensables aux Téléostéens pour se diriger et se déplacer, combinées aux ondulations du corps. Chez les Céphalopodes, et la seiche en particulier, les nageoires leur permettent de se déplacer lentement ou de se maintenir dans la colonne d'eau. Exclusivement carnivores, les Céphalopodes sont des prédateurs actifs, capables de mettre en œuvre des stratégies diverses pour chasser, ou encore pour s'accoupler (Agin et al., 2006 ; Palmer et al., 2006).

Au cours de l'évolution, la pression sélective du milieu aquatique a conduit à des adaptations semblables parmi différents groupes. On sait que les structures similaires entre Vertébrés et Céphalopodes sont le fruit de convergences, autrement dit, de l'acquisition de structures ou d'aptitudes similaires dans des lignées évolutives différentes.

La majorité des convergences entre les Céphalopodes et les Vertébrés constituent également des synapomorphies, des caractères dérivés partagés par les Céphalopodes au sein des Mollusques. C'est le cas, notamment, du système nerveux centralisé en un cerveau (Nixon and Young, 2003), à l'origine de comportements complexes, souvent rapprochés de ceux des Vertébrés (Hochner et al., 2003). Ils possèdent ainsi des capacités

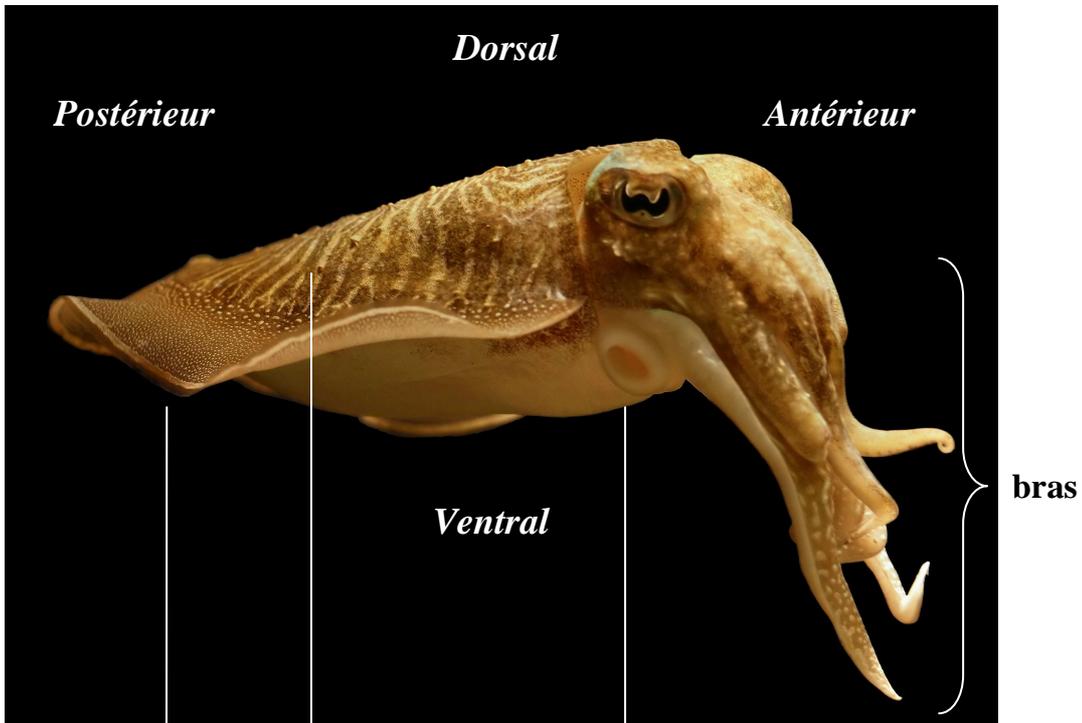
d'apprentissage et de mémorisation remarquables et leurs capacités de résolution de problèmes sont étonnantes (Bradley and Young, 1975).

Cependant les Céphalopodes partagent avec les autres Mollusques de nombreuses caractéristiques. Ils ont pour groupe frère les Gastropodes (Lecointre et Leguyader, 2001). Chez les deux organismes, on observe une courbure du tube digestif au cours du développement. Le tube digestif prend la forme d'un « U » chez l'individu adulte (la bouche est adjacente à l'anus). Ce phénomène appelé « flexion endogastrique » a lieu chez la larve trochophore pour les Gastropodes et directement chez l'embryon pour les Céphalopodes. En effet, les Céphalopodes ne présentent pas de stade larvaire mais ont un développement direct, une synapomorphie majeure par rapport aux autres Mollusques. Les juvéniles sont identiques à l'adulte. Les systèmes nerveux central et périphérique sont mis en place avant éclosion. Ils subissent ensuite des modifications liées au milieu de vie (Boletzky, 1988a).

Si leur appartenance aux Mollusques est un fait accepté, les Céphalopodes montrent des modifications frappantes concernant trois caractéristiques du groupe des Mollusques : la coquille, le manteau et le pied. Il s'agit de caractères dérivés ou synapomorphies (fig. 1). En effet, la coquille a été internalisée (exception faite pour le nautilé) et le manteau recruté pour de nouvelles fonctions, respiratoire et locomotrice ; l'unique pied des Mollusques a, quant à lui, été modifié en plusieurs bras préhensiles et en un entonnoir (Naef, 1923) participant à la fonction de locomotion. La locomotion est une des principales fonctions adaptées précisément au mode de vie. Celle-ci implique le complexe neuro-musculaire dans sa globalité. Cette fonction, utile dans la fuite et l'attaque, faisant intervenir les muscles du manteau et de l'entonnoir (l'hydrostat), est sous le contrôle du système nerveux. Suivant le mode de déplacement, lui-même lié au milieu de vie, et la nécessité d'échapper à des prédateurs, diverses adaptations du système nerveux se sont produites au cours de l'évolution. Si ces adaptations ont pu converger en partie comme chez les Céphalopodes et les Téléostéens, la comparaison des mécanismes moléculaires sous-jacents est indispensable à la compréhension de la mise en place de ce système d'un point de vue évolutif. Ces mécanismes sont bien connus chez les Vertébrés et les Ecdysozoaires mais très peu, voire pas du tout, chez les Lophotrochozoaires. Parmi ces derniers, le groupe des Céphalopodes montre des innovations morphologiques au niveau du système nerveux qui en font un groupe crucial à étudier dans une optique évolutive et comparée.

a.

vue latérale



nageoire

manteau

entonnoir

b.

vue ventrale

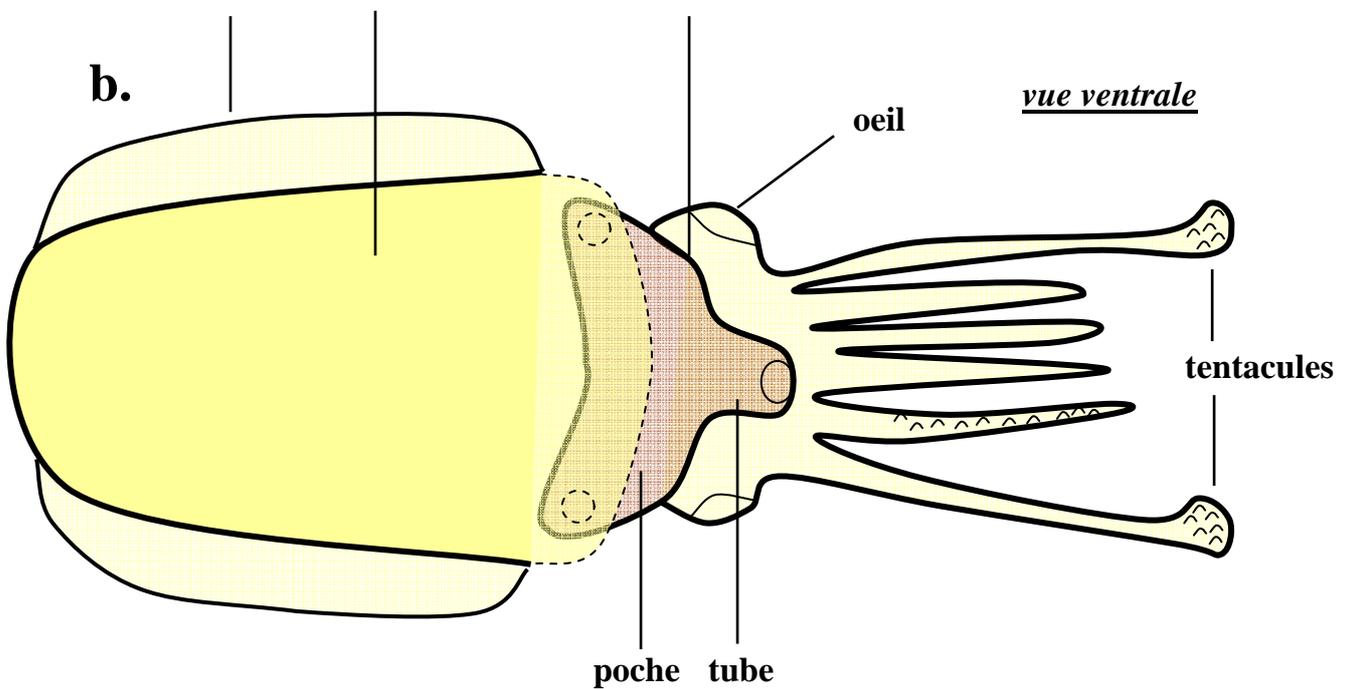


Figure 1 : a. : *Sepia officinalis*, vue latérale, principales structures visibles sur un individu adulte. b. : Schéma représentant une vue ventrale de *S. officinalis*. L'entonnoir se compose de la poche et du tube.

Au niveau du système nerveux périphérique, la diversité d'organisation entre les groupes de Céphalopodes est fonction des différences de mode de vie, et liée, entre autres, au mode locomoteur (fig.2). Les contraintes du milieu ont entraîné des adaptations qui portent sur les structures musculaires et nerveuses. Ainsi, la fuite par propulsion à réaction ou le camouflage via les chromatophores sont les deux principaux moyens des Céphalopodes pour échapper aux prédateurs. Suivant que l'organisme est benthique, pélagique ou necto-benthique, les espèces vont montrer un développement plus accentué d'un système ou de l'autre. Chez le calmar, espèce pélagique, la fusion de fibres géantes en axones géants permet une propulsion potentialisée, puisque l'information passe plus rapidement (un seul contact synaptique). La fuite est alors le mode de défense privilégié. A l'opposé, les Octopodes (pieuvres), Céphalopodes benthiques pour la plupart, ne possèdent pas de fibres nerveuses géantes et n'utilisent pas la propulsion par réaction, mais ils peuvent se mouvoir par reptation sur leurs bras et ventouses. De plus, ils possèdent un système extrêmement développé de chromatophores, organes neuromusculaires, qui leur confère leur principal mode de défense, le camouflage. Parmi tous les Céphalopodes, la seiche (*Sepia officinalis*) montre des caractères « intermédiaires » en relation avec son mode de vie, à l'interface du domaine benthique (proche du fond) et du domaine pélagique (en pleine eau), et pourrait donc être à l'interface du point de vue évolutif et adaptatif. La seiche se positionne donc comme un nouveau modèle de choix pour une étude Evo/Dévo. Elle possède non seulement des adaptations à la nage en pleine eau avec des fibres géantes innervant les muscles du manteau, mais aussi, un pattern de chromatophores très développé qui lui permet de se camoufler sur le fond. Le choix de la stratégie adoptée se fait par une analyse cognitive mettant en œuvre des structures sensorielles reliées au système nerveux central. C'est pendant le développement que se mettent en place les différentes structures adaptatives. Les mécanismes moléculaires sous-jacents sont les points clés à élucider pour comprendre de quelle façon ces différentes structures sont apparues au cours de l'évolution. C'est donc par une approche développementale que seront abordés ici les mécanismes ayant contribué à l'adaptation des Céphalopodes au milieu aquatique.

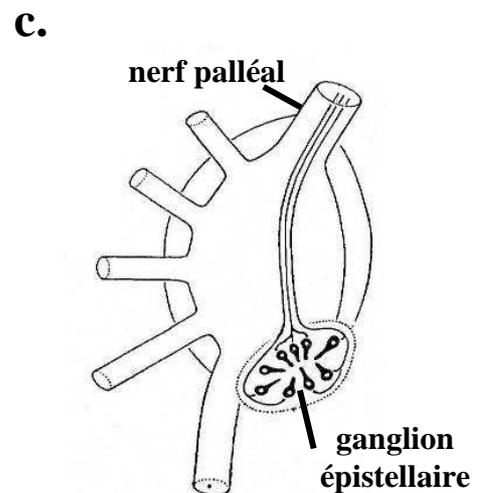
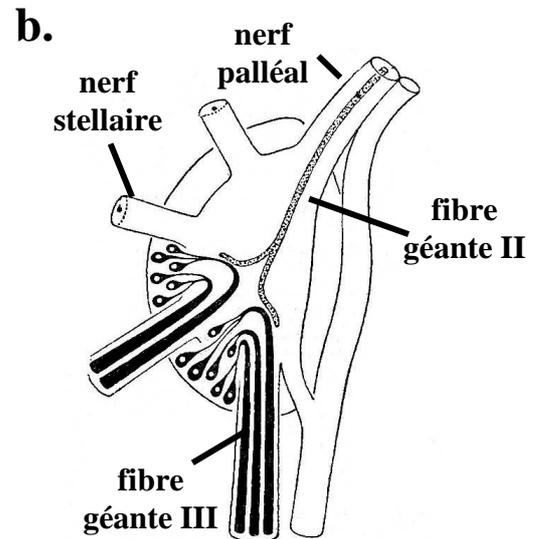
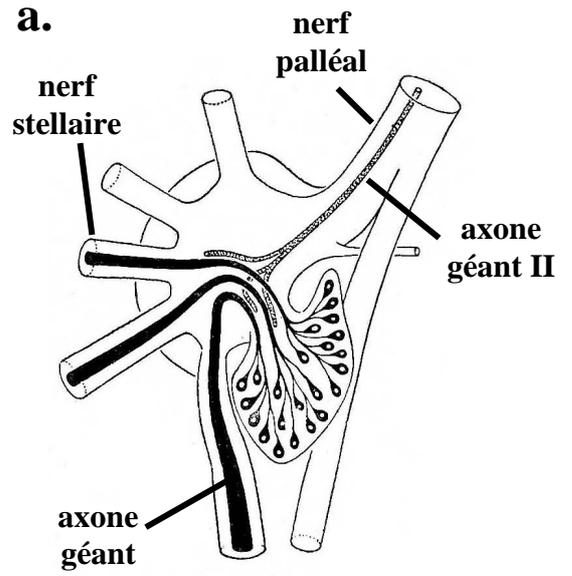
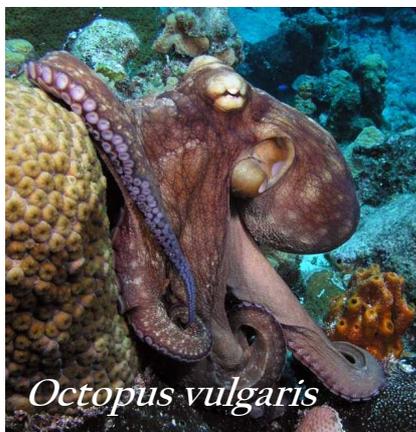
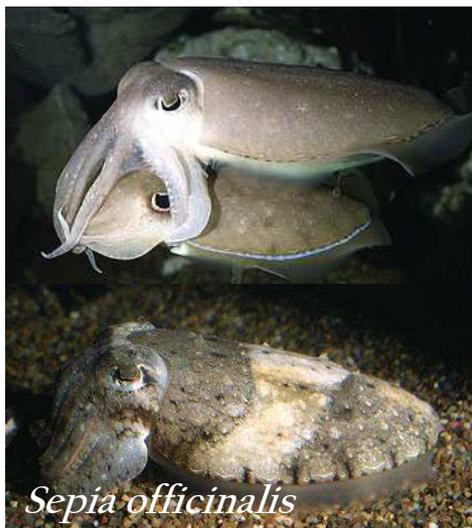


Figure 2 : Comparaison de la structure nerveuse du ganglion stellaire en fonction de l'espèce et de son milieu de vie aquatique, chez : **a.** calmar ; **b.** seiche. **c.** pieuvre. D'après Mangold, 1989.

Si les fonctions physiologiques du cerveau (système nerveux central) et de l'axone géant (système nerveux périphérique) sont de plus en plus étudiées chez l'individu adulte, les voies moléculaires à la base de leur développement restent inconnues. Le système neuro-musculaire des Céphalopodes est particulièrement dérivé par rapport aux autres Mollusques. De ce fait, l'étude des mécanismes moléculaires contrôlant la mise en place de ces particularités au cours du développement permet d'asseoir des hypothèses évolutives sur l'émergence de ces structures et fonctions, non seulement au sein des Lophotrochozoaires mais également au sein des Métazoaires.

La présente étude vise donc à caractériser certains de ces mécanismes moléculaires à l'origine de la fonction de locomotion durant l'embryogénèse d'un Céphalopode, *Sepia officinalis*, dans une optique évolutive et comparée.

1. La seiche : un nouveau modèle Evo-Dévo

1.1. Classification

Les Céphalopodes appartiennent à l'embranchement des Mollusques, lui-même appartenant au groupe de Lophotrochozoaires dans la division des Protostomiens. Les Céphalopodes sont divisés en deux taxa : les Nautiloidea et les Coleoidea. Les Nautiloidea ne comprennent que les Nautilus tandis que les Coleoidea englobent les Decabrachia, qui possèdent 10 bras dont la quatrième différenciée en tentacules et les Octobrachia à 8 bras.

Parmi les Decabrachia, on compte les Spirulida, les Sepiolidae, les Sepiidae, dont fait partie la seiche et les Teuthidae (calmars). Parmi les Octobrachia, on distingue les Vampyromorpha, les Cirroctopodidae et les Octopodae (pieuvres)

1.2. Cycle de vie

S. officinalis occupe les côtes atlantiques européennes, les côtes ouest africaine et la Méditerranée (Young et al., 1998). Les plus grands spécimens mesurent jusqu'à 50 cm sans les tentacules. *S. officinalis* vit dans les eaux côtières et sur la plaque continentale à des profondeurs de 150 m maximum. Il s'agit d'un animal necto-benthique, vivant dans la colonne d'eau, près du fond. *S. officinalis* est une espèce d'intérêt économique majeur (de 2000 à 10000 tonnes par an pêchées dans la Manche), avec un cycle de vie court : environ 18 mois (fig. 3). Elle peut se reproduire et pondre en captivité, ce qui permet de suivre le développement d'embryons en laboratoire.

Chez les Céphalopodes, les sexes sont séparés. Les gonades de *S. officinalis* restent indifférenciées jusqu'à la fin du développement embryonnaire. La distinction histologique des ovaires et testis n'est possible qu'au moment de l'éclosion. Cependant, les gonoductes pour les deux sexes et glandes nidamentaires des femelles sont visibles avant éclosion (Lemaire et Richard, 1970). La maturité sexuelle est acquise à un an environ. Le nombre total d'œufs pondus par une femelle peut varier de 500 à 1000 selon les tailles des femelles (Mangold –Wirz, 1963).

Lors de la période de reproduction, le mâle parade en modifiant son pattern de couleur. L'accouplement se fait « tête à tête ». La fécondation est interne. Le mâle utilise son bras ventral gauche, l'hectocotyle, qu'il introduit dans sa propre cavité de manteau pour prendre les spermatophores extrudés par son pénis. Les spermatophores sont transférés dans une poche spéciale, sous la masse buccale de la femelle. La ponte commence aussitôt après la copulation (Nixon and Messenger, 1977).

Les œufs sont déposés à intervalles réguliers de 2 à 3 minutes pendant plusieurs heures. L'ovaire, entouré du chorion, reçoit d'abord une enveloppe gélatineuse sécrétée par la glande de l'oviducte. Puis il est encore entouré par d'autres enveloppes gélatineuses sécrétées par les glandes nidamentaires. Ces enveloppes sont noires du fait de la mélanine contenue dans la poche à encre, caractéristique des Coleoidea. Les œufs sont ensuite conduits dans le tube de l'entonnoir. Les spermatozoïdes sont relâchés de la poche copulatoire sous la bouche, et pénètrent les différentes enveloppes. Enfin, les œufs sont fixés sur des supports tels que des stipes d'algues ou des feuilles de zostères, en faible profondeur dans la zone intertidale sur les côtes Atlantiques (Boletzky, 2006). La période de ponte s'étend de mars à septembre. Après la période de ponte, les individus s'étant accouplés ne se nourrissent plus et meurent en quelques semaines par cohortes. La durée de vie de *S. officinalis* varie de 18 à 24 mois.

Par rapport aux autres Mollusques, les Céphalopodes ont un développement direct, il n'y a pas de stade larvaire, ce qui permet une observation continue de la morphogenèse sans modifications dues à la métamorphose. Les jeunes éclos sont identiques à l'adulte et adoptent immédiatement le mode de vie (necto-benthique) de l'adulte. En milieu naturel, les juvéniles éclosent après environ deux mois et séjournent en général à proximité de leur lieu de naissance, dans les herbiers, avant de gagner de plus grandes profondeurs au début de l'automne afin d'éviter des températures trop basses. Ils entrent alors en phase de croissance.

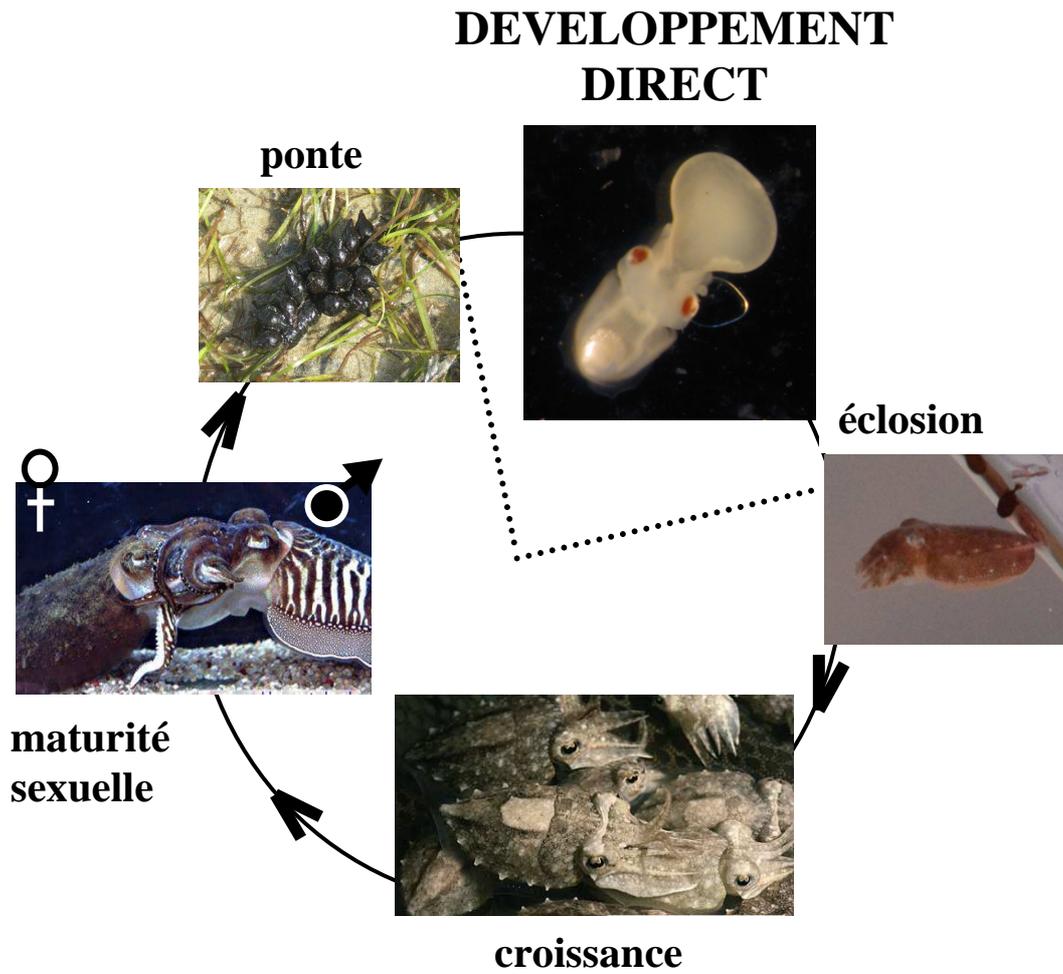


Figure 3 : Cycle de vie de *S. officinalis*

La seiche se nourrit de divers petits crustacés (crevettes, petits crabes, amphipodes) et poissons selon son âge et, donc, sa taille. Elle chasse à l'affût, tapie dans le sable, à moitié enterrée et fortement mimétique grâce à ses chromatophores, des structures neuromusculaires spécifiques aux Céphalopodes. A l'approche d'une proie, elle peut projeter ses deux tentacules afin de ramener la proie à la bouche, puis elle la déchiquète à l'aide de son bec corné et de sa radula (Blanc et al., 1998). Ces deux organes chitineux font partie du bulbe buccal. Si la radula est un organe caractéristique des Mollusques, le bec corné ou mandibules, est, lui, une synapomorphie des Céphalopodes. Il est souvent utilisé comme critère de détermination des espèces ou genres.

1.3. Embryogenèse

Les caractères développementaux des Céphalopodes sont primordiaux pour comprendre l'évolution de leurs structures. Les Céphalopodes ont de nombreuses particularités développementales qui influent, entre autres, sur les structures sensorielles. Les œufs de Céphalopode présentent notamment une segmentation discoïdale avec un œuf télolécithe, tandis que la plupart des Mollusques montrent une segmentation spirale. Une des principales caractéristiques est le fait qu'il s'agisse d'un développement direct. A la différence des autres Mollusques, il n'y a pas de passage par un stade larvaire trochophore et le juvénile sortant de l'œuf est semblable à l'adulte. Une étude evo-dévo sur un modèle à développement direct permet d'échapper aux remaniements morphologiques, donc, moléculaires, profonds dus à la métamorphose.

Chez les Lophotrochozoaires dont le développement est indirect, la larve trochophore est en contact direct avec le milieu. Elle possède des structures qui lui permettent de se déplacer, telle que la couronne ciliaire (Nielsen, 2005). L'embryon de Céphalopode est protégé dans l'œuf à l'intérieur duquel un individu en tout points identique à l'adulte se développe. Des structures en liaison avec ce mode de développement sont présentes chez l'embryon, comme l'organe de Hoyle qui permet au juvénile de déchirer les membranes de l'œuf à éclosion (Boletzky, 2006).

Chez *S. officinalis*, les œufs montrent des membranes noires mélanisées. Ces membranes bloquent le passage de la lumière, fortement variable dans les zones intertidales où les œufs sont pondus. Chez d'autres espèces de seiches, comme la seiche géante *Sepia apama*, les membranes des œufs ne sont pas mélanisées et les œufs restent blancs et transparents. Cette espèce vit à plus basse profondeur que *S. officinalis*, pouvant descendre jusqu'à plus de 500m (Aitken et al., 2005) où l'intensité de lumière varie beaucoup moins qu'à 200m (la profondeur maximale atteinte par *S. officinalis*, (Sherrard, 2000). De plus, *S. apama* accroche ses œufs dans des grottes, aux récifs coralliens. Ainsi, les œufs ne sont pas, ou très peu, exposés à la lumière. La mélanisation des œufs de *S. officinalis* pourrait donc bien être en relation avec un effet protecteur face à la lumière.

L'abaque utilisé pour définir les stades de l'embryogenèse de *S. officinalis* a été établi à partir de celui de Lemaire (1970). Il est néanmoins adapté à ce qui a pu être

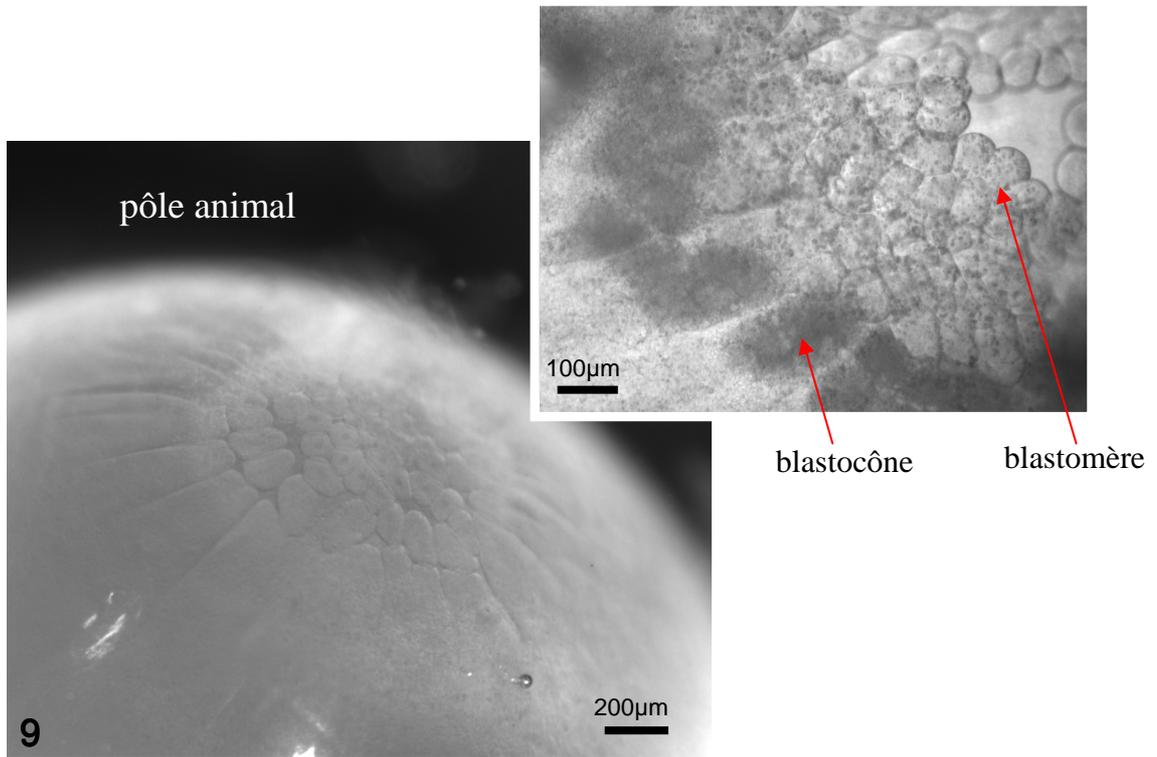
observé sur les pontes concernées par la présente étude. Le développement embryonnaire de la seiche est divisé en trois grandes phases :

- La segmentation : stades 1 à 9 (fig. 4). L'œuf, très riche en vitellus est du genre télolécithe : la segmentation est inégale et discoïdale (type méroblastique) à la différence de la majorité des Mollusques pour lesquels la segmentation de l'œuf est en spirale. Au stade 5, le blastoderme présente deux zones : une zone centrale constituée par deux cellules bien délimitées : les blastomères et une zone périphérique constituée par quatorze éléments dépourvus de limite périphérique : les blastocônes. Ce sont eux qui vont former le syncytium vitellin.

- La gastrulation : stades 10 à 15 (fig. 4). Elle débute par la mise en place de l'entomésoderme. Comme chez les autres organismes, c'est aussi à ce stade que va se former un tube digestif primitif. La gastrulation est achevée lorsque l'épibolie est terminée, c'est-à-dire quand le vitellus est totalement recouvert par le syncytium vitellin et l'ectoderme extra-embryonnaire.

- l'organogenèse : stades 15 à 30. Cette phase s'étend de la fermeture du sac vitellin au pôle végétatif à la résorption plus ou moins complète du sac vitellin externe. Cette période se termine à l'éclosion. les stades précoces, 15 à 19 (fig. 5), correspondent aux stades où l'embryon est sous forme de disque sur le pôle animal de l'œuf. Progressivement, l'embryon se redresse dans le sens antéro-postérieur du stade 20 à 22 (fig. 6). A partir du stade 23, l'embryon présente une conformation similaire à l'adulte avec le manteau au niveau postérieur et la tête et la couronne brachiale du côté du vitellus (fig. 7).

Segmentation : stades 1 à 9



Gastrulation : stades 10 à 14

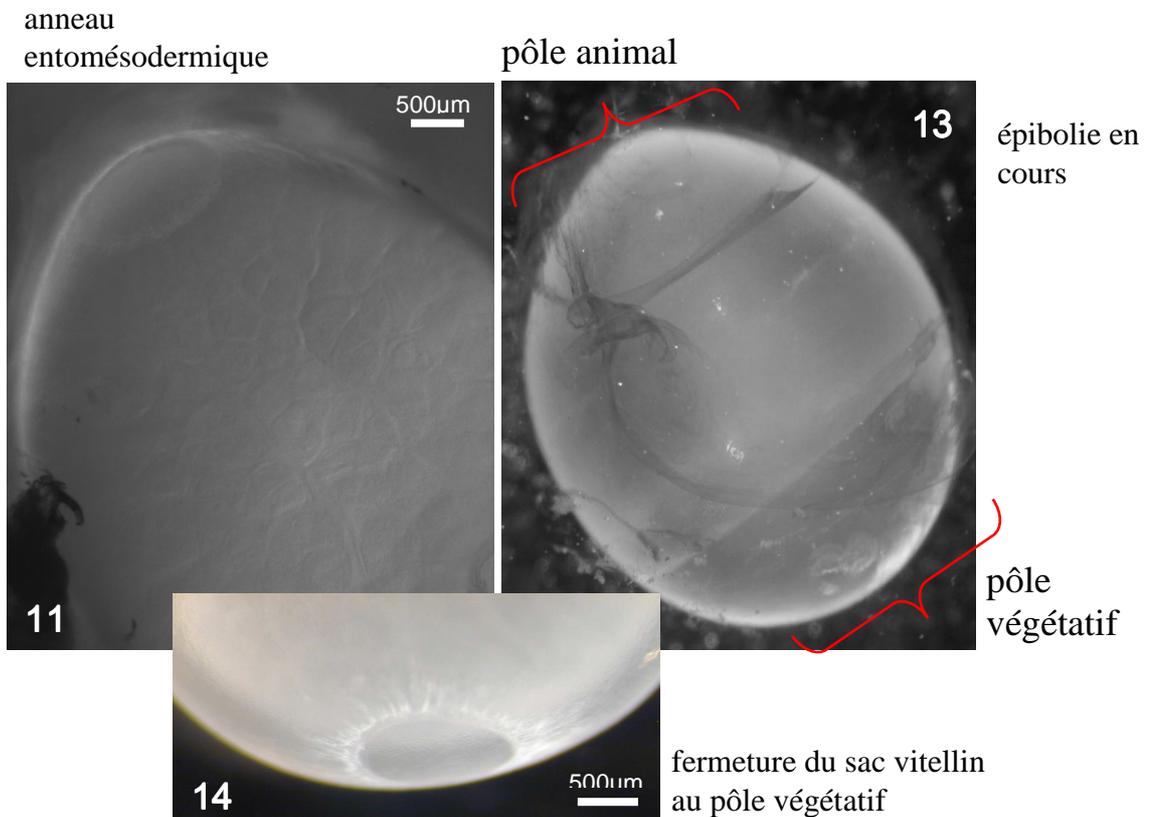
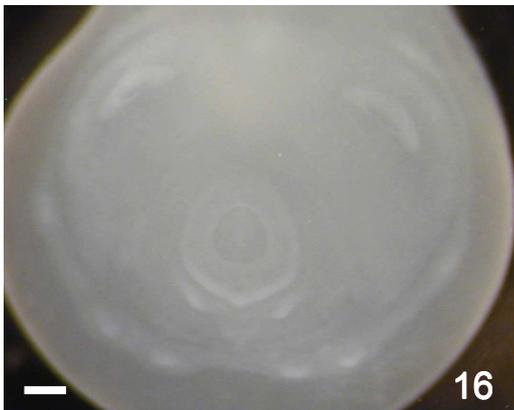
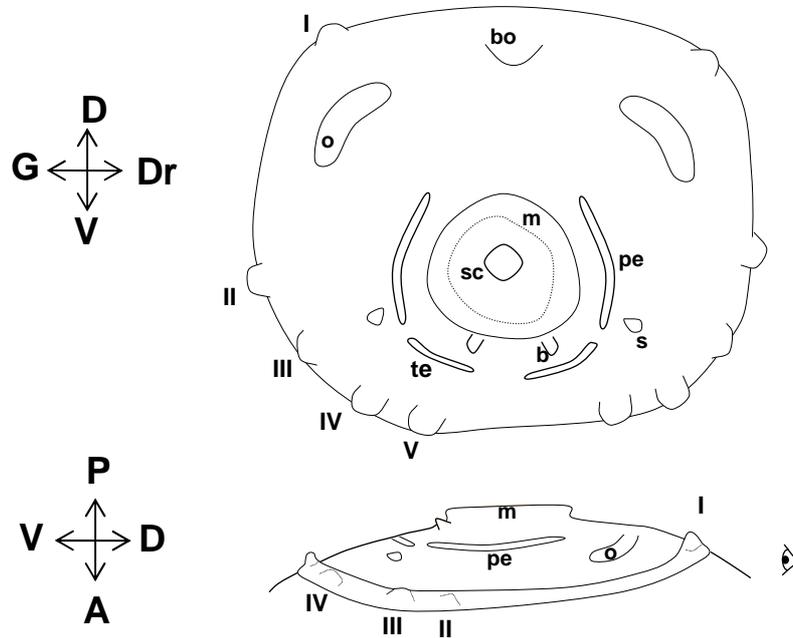


Figure 4 : Stades correspondant aux phases de segmentation et gastrulation chez *S. officinalis*.

Organogenèse

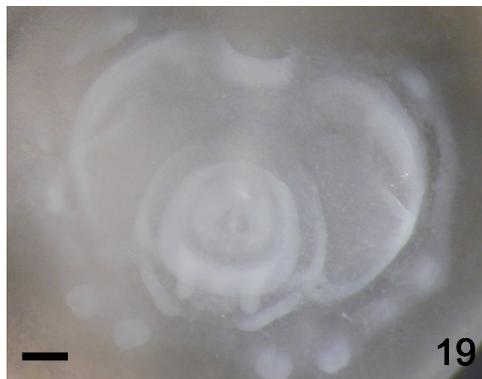
Phase « disque » : stades 15 à 19



16



17



19

Figure 5 : Stades correspondant aux phases précoces de l'organogenèse de *S. officinalis*. Echelle 500µm.

Légende : I, II, III, IV et V, bras ; b, branchie; bo, bouche ; m, manteau ; o, œil ; pe, poche de l'entonnoir ; s, statocyste ; sc, sac coquillier ; te, tube de l'entonnoir ; A, antérieur ; D, dorsal ; Dr, droite ; G, gauche ; P, postérieur ; V, ventral

Organogenèse

Phase de redressement : stades 20 à 22

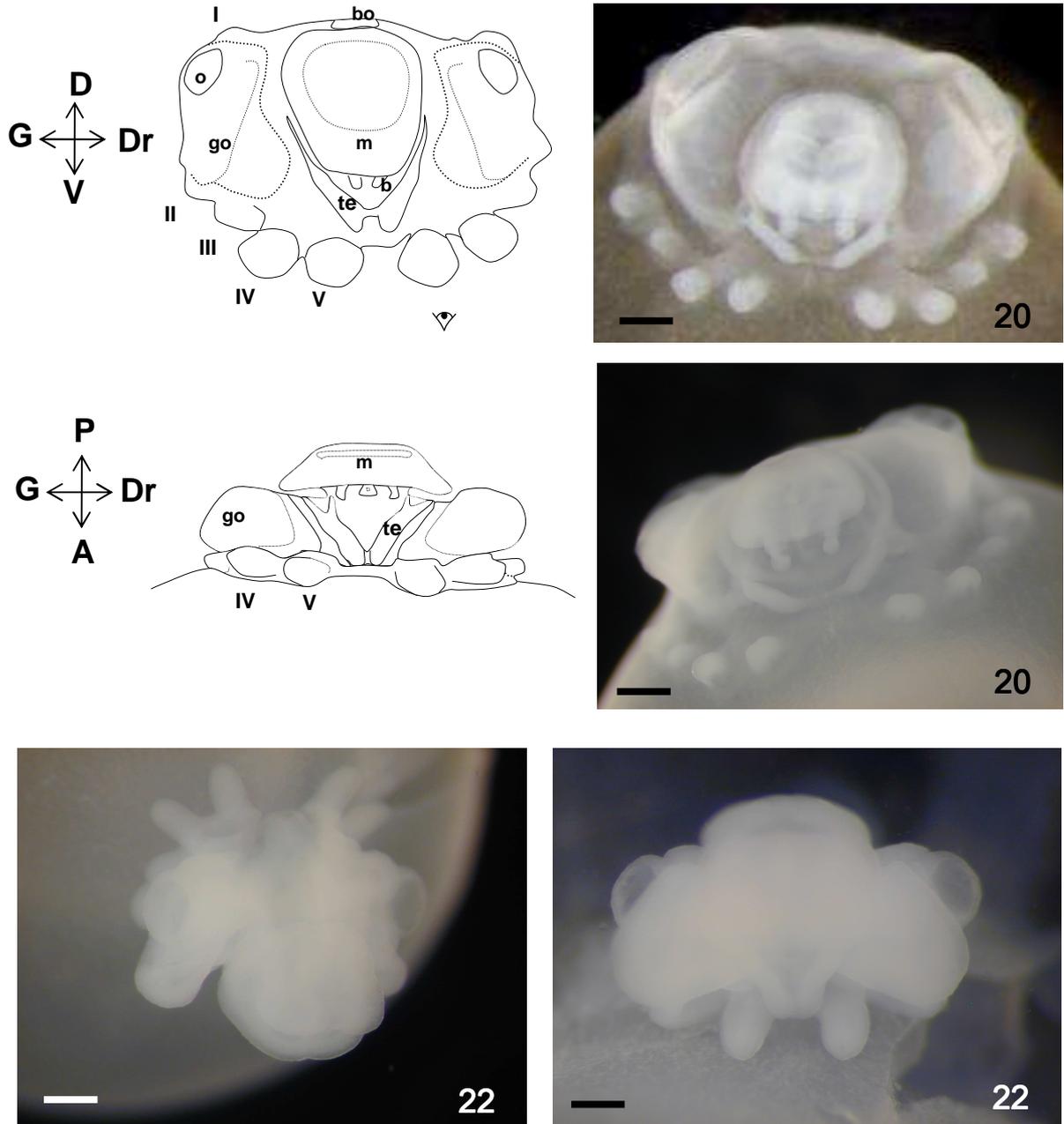


Figure 6 : Stades correspondant aux phases de redressement lors de l'organogenèse de *S. officinalis*. Echelle 500µm.

Légende : I, II, III, IV et V, bras ; b, branchie; bo, bouche ; go, ganglion optique ; m, manteau ; o, œil ; te, tube de l'entonnoir ; A, antérieur ; D, dorsal ; Dr, droite ; G, gauche ; P, postérieur ; V, ventral.

Organogenèse

Phase de conformation adulte : stades 23 à éclosion

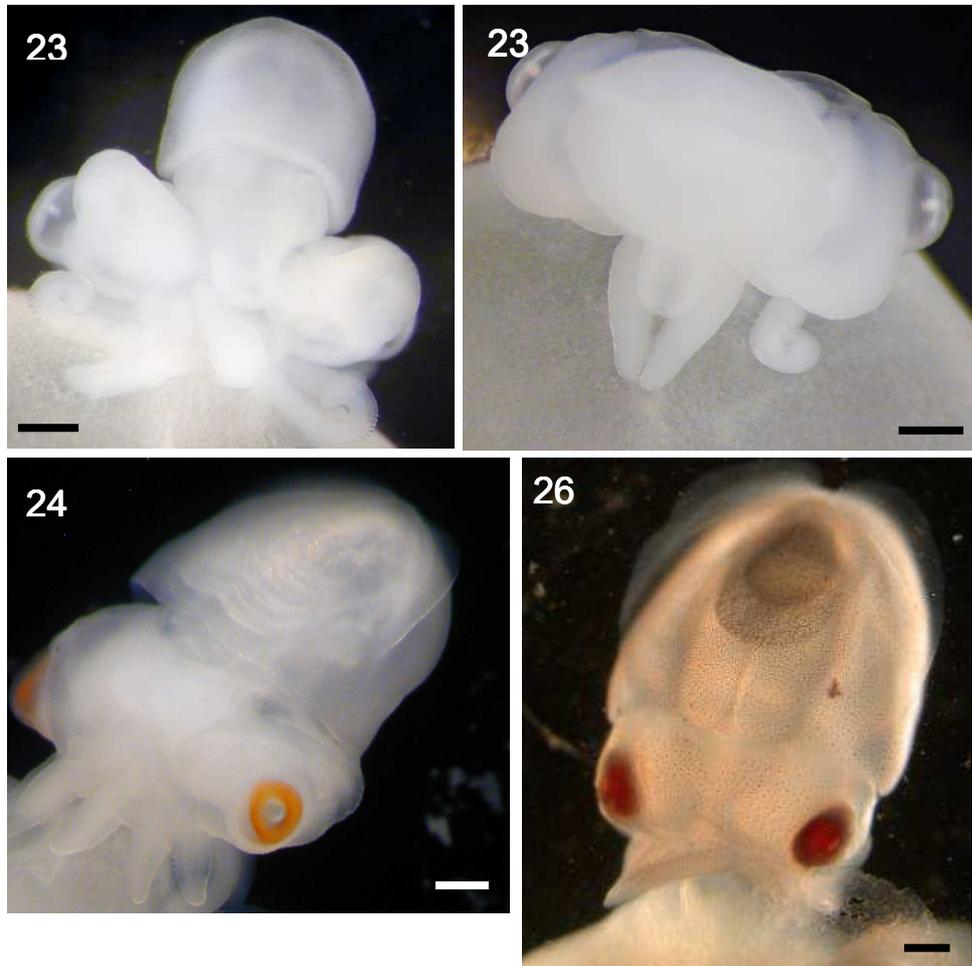
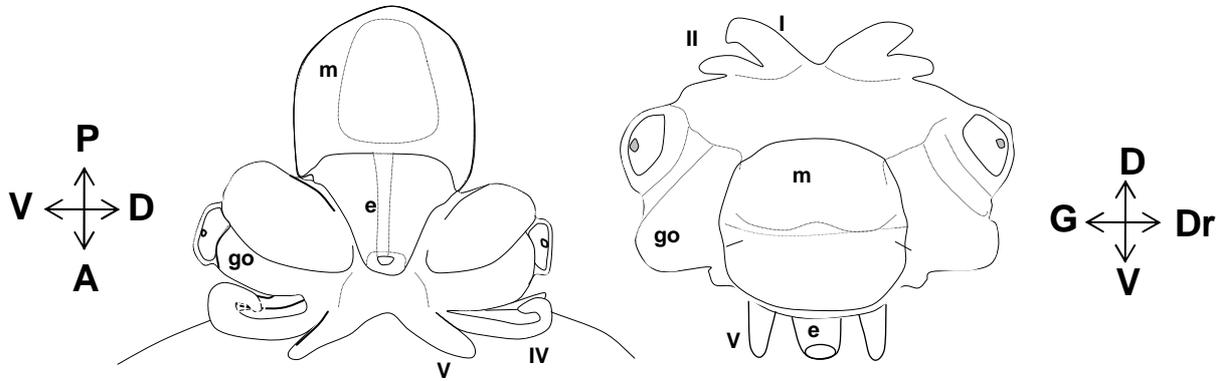


Figure 7 : Stades correspondant aux phases tardives de l'organogenèse de *S. officinalis*.
Echelle 500µm.

Légende : I, II, III, IV et V, bras ; e, entonnoir ; go, ganglion optique ; m, manteau ; o, œil ; A, antérieur ; D, dorsal ; Dr, droite ; G, gauche ; P, postérieur ; V, ventral.

L'orientation du corps ne répond pas aux conventions classiques chez la seiche et chez les Céphalopodes de façon plus générale. Lorsque l'embryon est encore sous forme de disque (stades 15 à 20), le stomodeum comprenant la bouche est alors dorsal, le pôle antérieur du futur adulte comprenant les bras et tentacules se situe à la périphérie du disque, alors que le pôle postérieur (manteau, branchies et entonnoir) est au centre. A partir du stade 21, l'embryon se redresse et les yeux, la bouche et la couronne brachiale se retrouvent du côté du vitellus, tandis que la masse viscérale et le manteau sont à l'opposé. Les mécanismes de mise en place des régions antéro-postérieur et dorso-ventral pourraient donc être différents de ce qui est connu jusqu'à présent. L'absence de chaîne nerveuse ventrale ou dorsale, structure organisatrice de la plus haute importance dans de nombreux autres groupes (Coolen et al., 2009 ; Holland, 2002), ne fait que renforcer l'intérêt majeur de connaître les mécanismes moléculaires participant à la formation d'un tel organisme. La mise en place des axes du corps a des conséquences importantes sur l'organisation du système nerveux, particulièrement complexe et dérivé des Céphalopodes.

2. La locomotion, fonction essentielle dépendante du système neuro-musculaire

2.1. La locomotion

Le système locomoteur et les muscles associés ne sont pas sous les mêmes contraintes sélectives en milieu aquatique et en milieu terrestre. En ce qui concerne les Céphalopodes actuels, Seul *Nautilus* présente une coquille externe divisée en plusieurs chambres (phragmocones) divisées à leur tour en loges. Ces loges sont percées en leur milieu par un siphon (Nixon and Messenger, 1977). Le nautilite nage par propulsion comme les Céphalopodes à coquille interne. Il ajuste ensuite sa flottabilité avec du gaz pompé dans les chambres de sa coquille via le siphon. Le mouvement de propulsion du nautilite ne va dépendre que d'un petit volume d'eau, d'une faible pression dans la cavité du manteau, d'une vitesse de propulsion réduite et d'une masse musculaire peu importante par rapport aux Céphalopodes à coquille interne (Grassé, 1989). Ainsi, sa poussée n'est que d'un huitième de celle d'un calmar de même taille, alors que sa vitesse de propulsion n'est que d'un dixième (Chamberlain, 1990). La survie de *Nautilus* suppose un mode de vie lent à mouvements verticaux et l'animal doit chercher sa nourriture dans les habitats où la compétition avec des nageurs rapides et agiles est minimale. Les Céphalopodes fossiles ont eu à faire face à des contraintes de configuration semblables qui ont probablement contribué à leur déclin. Chez les autres Céphalopodes, la régression de la coquille a eu des conséquences considérables sur le système locomoteur de l'animal en milieu aquatique et implique des adaptations morphologiques anatomiques majeures telles que la modification du manteau et la présence d'un entonnoir et de bras, dérivés de l'unique pied des Mollusques. L'évolution de ces structures a été certainement un évènement clé pour l'adaptation des Céphalopodes dans les océans pendant le Cambrien tardif, il y a 500 millions d'années (Holland, 1987 ; Saunders and Landman, 1987 ; Young et al., 1998). Le manteau, les bras et l'entonnoir composent l'hydrostat, indispensable pour la propulsion par réaction. Ces structures musculaires constituent un appareil locomoteur très puissant. Les muscles circulaires du manteau se contractent et réduisent alors le volume de la cavité palléale, chassant ainsi l'eau par l'entonnoir et permettant un mouvement par propulsion.

Le surcroît d'énergie nécessaire à de tels mouvements est fourni grâce, notamment, à un appareil circulatoire clos qui permet une meilleure distribution de l'oxygène (Mangold and Bidder, 1989).

La seiche peut également se déplacer lentement par action de ses nageoires afin de réaliser de petits mouvements ou de changer de direction. Elle s'en sert, par exemple, pour se surélever légèrement par rapport au fond. Quand il lui est nécessaire de se déplacer plus rapidement, elle utilise son entonnoir pour se propulser en arrière. Elle est capable de faire du surplace ou de bouger verticalement dans la colonne d'eau en faisant onduler ses nageoires ou en modifiant la flottabilité de sa coquille.

L'os de seiche, structure aragonitique, est le premier facteur utile à la seiche dans ses déplacements. Il lui sert de flotteur grâce à une consistance très poreuse jouant sur des équilibres liquide/gaz, limitant l'effort nécessaire pour se maintenir entre deux eaux. La coquille est produite par l'épithélium du sac coquillier qui s'étend du côté dorsal de l'embryon. Baratte et al. (2007) ont montré une implication de la protéine *Engrailed* dans la formation de ce sac. Rien n'est su, cependant, concernant le contrôle moléculaire des muscles du manteau associés au sac coquillier.

La fonction respiratoire du manteau s'accomplit au niveau antérieur, tandis que la région postérieure est dédiée à la fonction de locomotion. La contraction des muscles circulaires produit une expulsion d'eau hors de la cavité du manteau. Les fibres longitudinales dans les muscles rétracteurs de la tête et de l'entonnoir tirent ces structures vers la cavité du manteau et, avec les muscles du manteau, augmente la force d'expulsion de l'eau. Les fibres musculaires sont contrôlées par le système de fibres géantes qui permet une conduction très rapide et assure une contraction globale et simultanée de toutes les fibres musculaires du manteau pour déclencher des mouvements de fuite rapides grâce à l'expulsion de jets d'eau par le manteau, à travers l'entonnoir. Les structures participant à la fonction de locomotion sont mises en place très tôt durant l'embryogenèse de *S. officinalis*. L'embryon de seiche bouge déjà dans l'œuf à des stades 24/25 et réagit à des stimuli mécaniques. Aux stades suivants, on observe des mouvements de propulsion à l'intérieur du chorion alors complètement désolidarisé de l'embryon. Les structures, identiques à l'adulte, participant à la locomotion, aussi bien musculaires que nerveuses, sont donc mises en place bien avant éclosion.

2.2. Le système nerveux

2.2.1. Le développement du système nerveux

Pendant la phase en disque, où tous les organes commencent à se former, le stomodeum est dorsal, le pôle oral (antérieur) du futur adulte est situé à la périphérie de l'embryon (couronne brachiale et stomodeum), alors que le futur pôle aboral (ou postérieur pour l'adulte) est central (manteau, branchies, entonnoir). Les territoires présomptifs des ganglions cérébroïdes sont situés de chaque côté de la future bouche et se développent ensuite vers les yeux (fig. 8a). Au stade 20, ils forment une unité morphologique avec les futurs ganglions optiques entourant les vésicules optiques. Les lobes olfactifs présomptifs se situent sous le lobe optique, ventralement. Au stade 16, les ganglions viscéraux commencent leur développement en deux territoires de chaque côté du manteau, en bas des tubes de l'entonnoir. Ils rejoignent ensuite les ganglions optiques au stade 20.

Après la phase en disque, l'embryon commence à se redresser (stades 21 à 23) (fig. 8b). Les yeux, la bouche et la couronne brachiale sont situés au céphalopodium (côté vitellus) et le viscéropallium (masse viscérale, cavité palléale et le manteau) au côté opposé (Baratte et al., 2007). Les appendices se différencient en huit bras et deux tentacules, fonctionnellement différents chez l'adulte. Les ganglions se différencient en plusieurs lobes, chacun ayant un rôle précis, moteur ou sensoriel. Les ganglions commencent à se condenser au stade 23 pour former un complexe dans la tête de l'embryon (fig. 8c). Ils se différencient en lobes, peu avant éclosion. Le cerveau est établi avant éclosion mais des changements ont lieu pendant la phase de transition, du juvénile à l'adulte, principalement en ce qui concerne les proportions relatives des différentes parties du cerveau.

Le cerveau entoure l'œsophage, formant une partie supra et sous-œsophagienne, chacune d'elles étant subdivisée en plusieurs lobes. La partie dorsale, supra-œsophagienne, ayant pour origine les ganglions dits « cérébroïdes » comprend les lobes verticaux, frontaux, optiques, olfactifs et buccaux, impliqués dans l'analyse des afférences sensorielles. La partie ventrale, sous-œsophagienne, est composée de centres moteurs comme les lobes palléoviscéraux et pédieux.

Quant au système nerveux périphérique, les deux ganglions stellaires, structures caractéristiques des Céphalopodes, commencent leur développement sur les côtés droit et

gauche du manteau, dès le stade 19 sur les bords du sac coquillier présomptif (Baratte and Bonnaud, 2009) et les ganglions brachiaux se situent tout le long de la couronne brachiale et se développent à côté des bras.

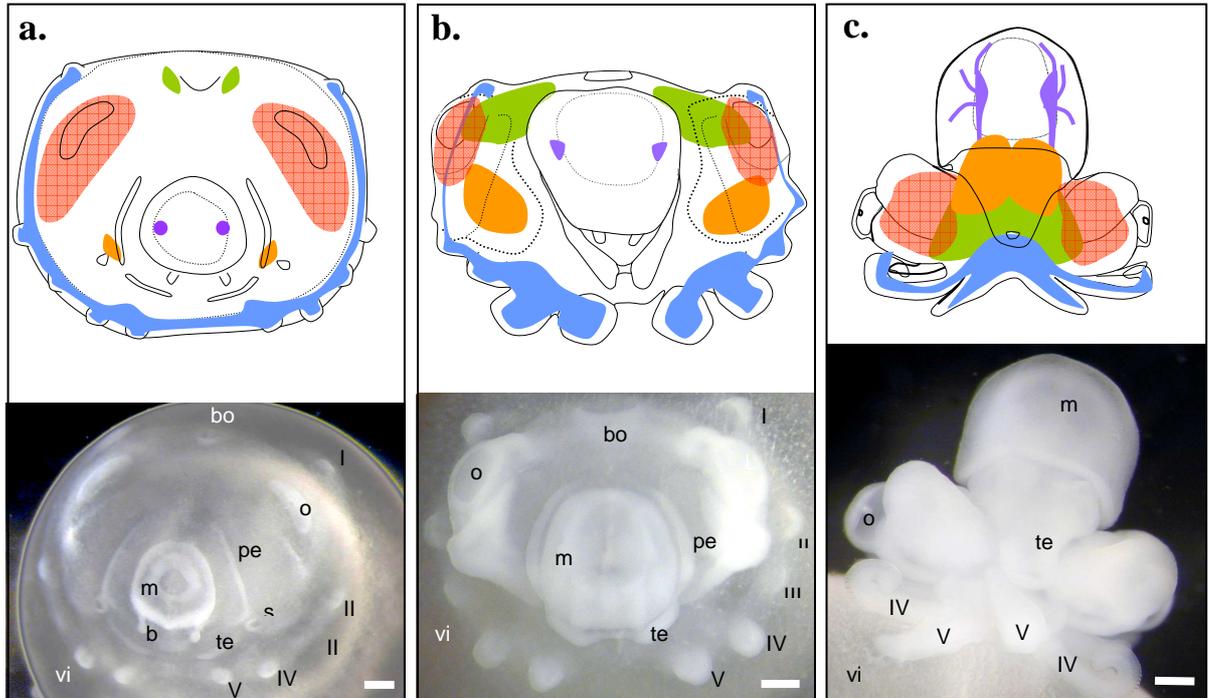
Les différents lobes composant le cerveau entament leur développement sous forme de domaines pairs disposés de part et d'autre d'une ligne imaginaire coupant le futur manteau en deux, constituant l'axe de symétrie droite/gauche de l'embryon. Les lobes optiques et les ganglions stellaires restent séparés en deux paires de part et d'autre de l'axe de symétrie droite/gauche de l'embryon.

Chez l'individu adulte, la masse cérébrale est divisée en deux lobes droit et gauche parfaitement symétriques. Les nerfs cérébraux partant de chaque côté ne se croisent pas et innervent donc les territoires se trouvant du même côté. Toutefois, des commissures nerveuses permettent la communication entre les ganglions et, ainsi, la coordination de la réponse entre côté droit et côté gauche (Grassé, 1989). Les processus moléculaires d'établissement de la bilatéralité neurale restent encore totalement inconnus chez ces espèces dépourvues d'axe nerveux central. Chez les Vertébrés, on sait que la bilatéralité du système nerveux se met en place autour de la corde neurale (Levin, 1997 ; Coolen et al., 2009). Or, les Céphalopodes ne possédant pas de corde neurale ou de structure équivalente, l'un de nos objectifs a été de mettre en évidence les mécanismes moléculaires, qui contrôlent la bilatéralité pendant le développement des Céphalopodes.

Stade 18 (vue apicale)

Stade 21 (vue apicale)

Stade 24 (vue ventrale)



■ ganglions brachiaux

■ ganglions viscéraux

■ ganglions optiques

■ ganglions stellaires

■ ganglions cérébroïdes

Figure 8 : Territoires neurax embryonnaires pendant le développement de *S. officinalis*. Echelle 500µm.

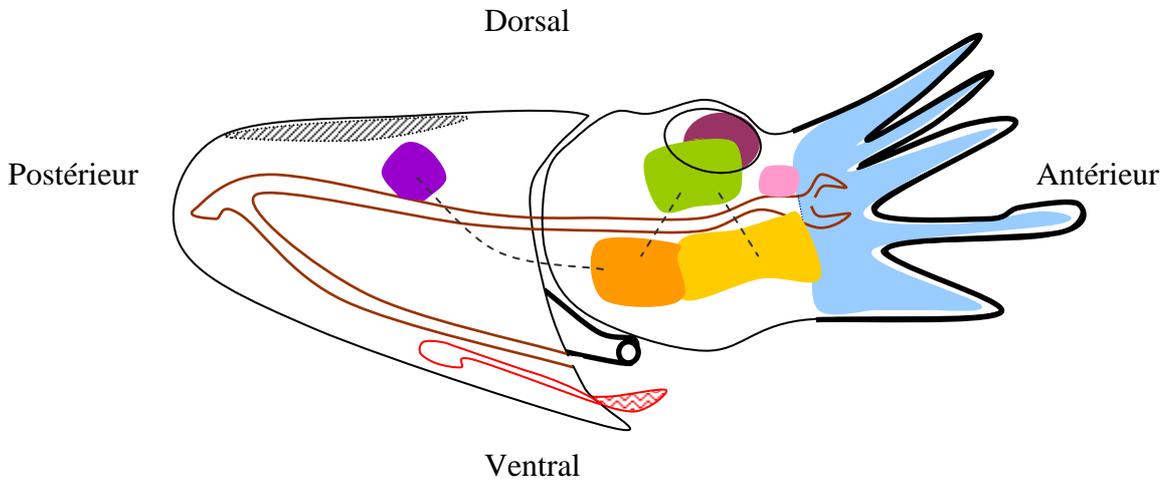
Légende : I, II, III, IV et V, bras ; b, branchie ; bo, bouche ; m, manteau ; o, œil ; pe, poche de l'entonnoir ; te, tube de l'entonnoir ; s, statocyste ; vi, vitellus.

2.2.2. Le système nerveux central

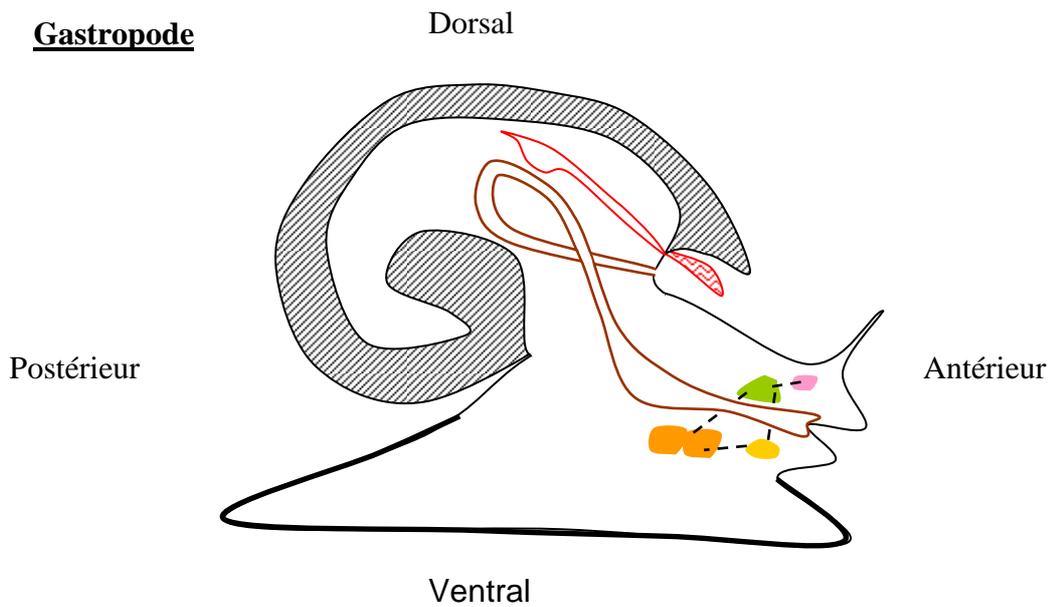
Tous les Céphalopodes actuels ont un système nerveux bien développé et un véritable cerveau, ce qui constitue une différence majeure par rapport aux autres Mollusques et une convergence importante avec les Vertébrés. Le cerveau des Céphalopodes est complexe et se compose de nombreux lobes, fonctionnellement hiérarchisés. Vingt-cinq lobes majeurs ont été caractérisés dans le cerveau des Coléoidés et des sous-divisions ont permis de définir quarante lobes en tout.

Le phénomène de céphalisation, une concentration du système nerveux dans la tête, observé chez les Céphalopodes est également notable chez les Gastropodes (fig. 9). On distingue chez les Gastropodes des ganglions cérébroïdes supra-œsophagiens et une masse nerveuse sous-œsophagienne comprenant des ganglions pédieux, à l'avant, et viscéraux, à l'arrière. Ces ganglions sont reliés par des connectifs nerveux et forment un triangle caractéristique (Lecointre et Leguyader, 2001). Ces terminologies identiques se justifient par le fait que les ganglions des Céphalopodes et ceux des Gastropodes partagent des fonctions similaires. En effet, les ganglions dits cérébroïdes reçoivent, dans les deux cas, les afférences des organes sensoriels, yeux, statocystes et tentacules, par exemple, tandis que les ganglions pédieux sont en liaison avec le pied ou les bras et les ganglions viscéraux contrôlent les muscles viscéraux. Ces structures, bien qu'ayant une dénomination similaire entre Gastropodes et Céphalopodes, présentent des différences importantes qui questionnent leur possible homologie. Le cerveau des Céphalopode est entouré par une capsule cartilagineuse, à la différence des Gastropodes. De plus, il existe une véritable cérébralisation chez les Céphalopodes chez lesquels il y a coalescence entre les ganglions pédieux et viscéraux. Enfin les degrés de complexité fonctionnels sont tout à fait différents puisque les Gastropodes ne présentent qu'environ neuf ganglions selon les espèces contre vingt-cinq lobes majeurs pour les Céphalopodes Coléoides (Packard, 1972). Chez les Gastropodes, il n'y a pas de différenciation des ganglions en lobes et donc pas de sous-fonctionnalisation. Il convient donc d'être prudent sur les comparaisons entre ces deux organismes.

Seiche



Gastropode



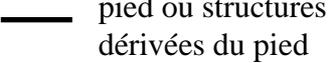
- | | | |
|--|---|---|
|  ganglions brachiaux |  ganglions pédieux |  ganglions buccaux |
|  ganglions optiques |  ganglions cérébroïdes |  ganglions viscéraux |
|  ganglions stellaires |  coquille |  branchies |
|  coeur |  tube digestif |  pied ou structures dérivées du pied |

Figure 9 : Comparaison entre le système nerveux d'un Gastropode et celui de *S. officinalis*.

2.2.2.1. Le cerveau

En termes physiologiques, le système nerveux central intègre et traite des informations sensorielles provenant de la périphérie et initie une réponse de l'organisme via des neurosécrétions dans le liquide sanguin ou une stimulation directe de muscles. Au niveau anatomique, le SNC, tissu nerveux délimité, comprend des agglomérations distinctes de neurones spécialisés fonctionnellement connectés entre eux par des axones (neuropile) ; il peut prendre différentes formes et avoir des degrés de complexité variables au sein des différents phyla.

Chez les Céphalopodes, le SNC est enfermé dans une capsule cartilagineuse. Il est constitué initialement par des ganglions typiques de Mollusques mais qui se différencient en plusieurs lobes avec des fonctions spécifiques, établissant une hiérarchie dans le traitement de l'information (fig. 10). La masse supra-œsophagienne reçoit des informations sensorielles et la masse sous-œsophagienne est rattachée aux fonctions motrices (fig. 11). Au niveau péri-œsophagien se trouvent les lobes magnocellulaires.

Les différents lobes du cerveau présentent la même structure médullaire : un cortex constitué des corps cellulaires des neurones entoure le neuropile, une zone fibrillaire (Mangold, 1989). Cette zone est composée d'un enchevêtrement des neurites (axones et dendrites) de ces mêmes neurones et de cellules gliales assurant l'homéostasie du milieu neuronal (astrocytes) et la myélinisation des axones (oligodendrocytes). Les neurones du cerveau font entre 5 et 10 μm mais les plus grands neurones moteurs peuvent atteindre jusqu'à 100 μm . L'épaisseur des fibres nerveuses est également variable, elle va de 1 μm jusqu'à 1 mm. Les fibres les plus épaisses sont les fibres géantes.

En 1961, Boycott apporte de nouvelles connaissances concernant l'organisation fonctionnelle du cerveau de *S. officinalis* grâce à des expériences d'électrostimulation et permet de déterminer de nouvelles subdivisions au sein des différents lobes suivant les effets des stimuli électriques. Les lobes sous-œsophagiens sont alors classés en centres moteurs « moyen » ou « inférieur » en fonction du type de réponses après stimulation et de leurs connexions périphériques. Au niveau des lobes supra-œsophagiens, sont décrits des centres moteurs « supérieurs » ainsi que des zones dites "silencieuses". D'autres expériences, toujours par stimulations électriques, ont permis d'affiner ces subdivisions et de déterminer plus précisément les rôles et connexions au niveau du cerveau de *S. officinalis* (Chichery and Chanelet, 1976, 1978).

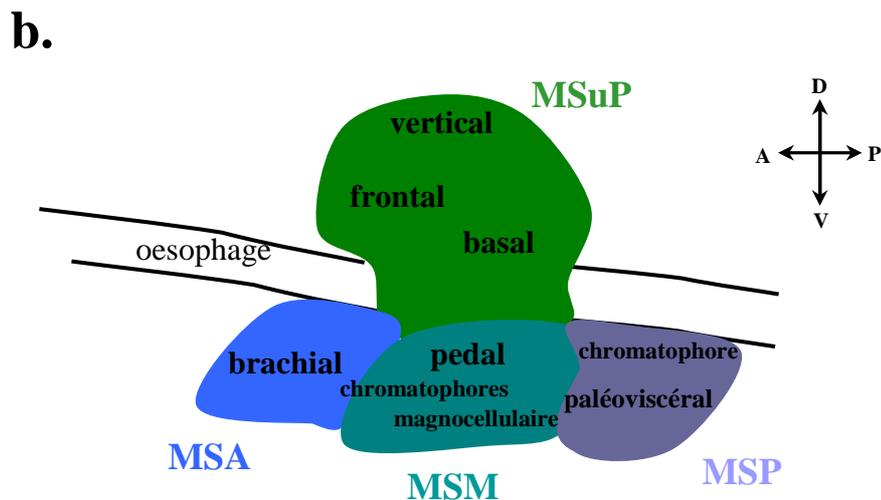
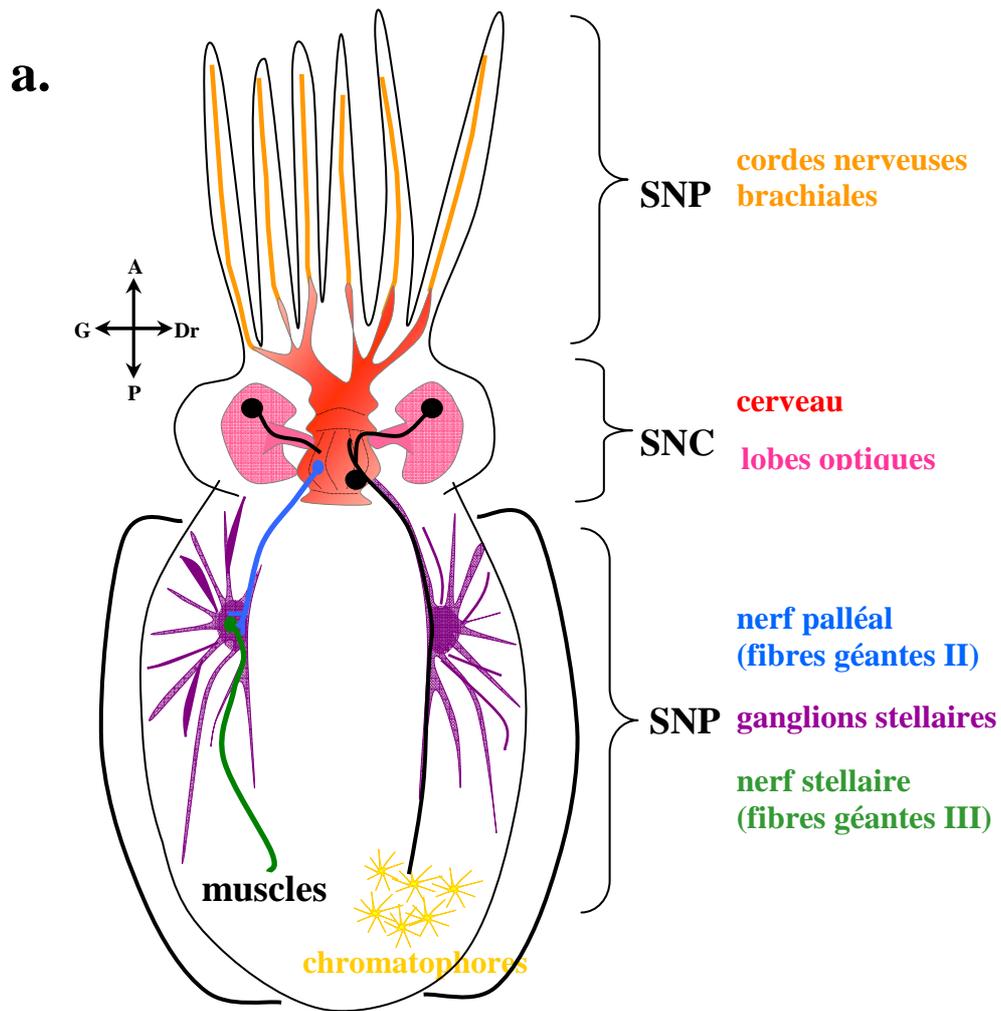


Figure 10 : **a.** vue dorsale d'une seiche adulte, représentation schématique du système nerveux. **b.** représentation du cerveau d'une seiche adulte en vue latérale. Les noms des lobes sont indiqués sur le dessin dans les positions correspondantes. MSA, masse sous-oesopgagienne antérieure ; MSM, masse sous-oesopgagienne moyenne ; MSP, masse sous-oesopgagienne postérieure ; MSuP, masse supra-oesopgagienne.

La masse supra-œsophagienne se compose dorsalement des lobes vertical, frontal supérieur et frontal inférieur et ventralement, du lobe basal (fig. 10). Sous le lobe vertical se trouve le lobe subvertical puis le lobe précommissural. Le lobe frontal contrôle les mouvements des bras et de la masse buccale (capture des proies), tandis que le lobe vertical est impliqué dans la mémoire et l'apprentissage. Le reste de la masse supra-œsophagienne se compose du lobe basal. Le lobe basal comprend les lobes sub-pédonculés et pédonculés et les lobes olfactifs. Les lobes basaux seraient impliqués dans le mouvement de la tête, des yeux, de la masse buccale, bras, tentacules et nageoires et dans le contrôle de la respiration, de la locomotion, de la nage et des chromatophores (Chichery and Chanelet, 1978).

La masse sous-œsophagienne est divisée en masses antérieure, moyenne et postérieure (fig. 10). Chacune de ces masses est à son tour divisée en plusieurs lobes. La masse sous-œsophagienne antérieure se compose du lobe brachial associé à dix nerfs, un pour chaque bras et tentacule. La masse sous-œsophagienne médiane est divisée en quatre parties : les lobes pédieux antérieurs, postérieurs et latéraux et le lobe latéral des chromatophores. Les lobes pédieux antérieurs et postérieurs sont impliqués dans les mouvements des bras, des tentacules et des muscles rétracteurs de la tête et contrôlent les nerfs de l'entonnoir. Les lobes pédieux latéraux contiennent les centres oculomoteurs et les 6 nerfs allant vers les muscles optiques. Enfin, la masse sous-œsophagienne postérieure est constituée des lobes palléoviscéraux centraux et des deux lobes postérieurs des chromatophores. Le lobe palléoviscéral central a des rôles dans la communication, la respiration et diverses fonctions des viscères et contrôle également la poche à encre. A l'arrière du lobe palléoviscéral, se situent les lobes vasomoteurs dorsal et ventral. Sur chaque côté du lobe palléoviscéral et entre les lobes vasomoteurs, se trouve la partie postérieure du lobe magnocellulaire. Devant le lobe magnocellulaire, impliqué dans la respiration et dans le contrôle des statocystes, des fibres géantes forment le lobe magnocellulaire ventral. Enfin, dorsalement, le lobe magnocellulaire passe devant les lobes basaux latéraux et rejoint le lobe basal dorsal (Young, 1939).

Il semblerait donc que le SNC des Céphalopodes réponde bien à la définition d'un cerveau, aussi bien morphologiquement qu'anatomiquement. Ce terme, cependant, ne signifie pas que cette structure, présente dans de nombreux phyla, dérive d'une même structure présente chez un ancêtre commun. En effet, les Céphalopodes sont le seul groupe parmi les Mollusques à posséder un tel niveau de centralisation du système nerveux.

De plus, le fait qu'ils soient dépourvus de cordon nerveux central, structure clé dans la formation du cerveau des Vertébrés, suggère que le SNC des Céphalopodes se forme de façon totalement différente pendant l'embryogénèse. Concernant le contrôle moléculaire de la mise en place du SNC des Céphalopodes, seules deux études se sont intéressées au gène *Pax6*, gène « maître » dans la formation des organes photosensoriels chez de nombreux groupes (Gehring et al., 2008) ; *Pax6* est exprimé dans les ganglions viscéraux et optiques pendant le développement d'un calmar, *Loligo pealii* (Tomarev et al., 1997) et d'une sépiole, *Euprymna scolopes* (Hartmann et al., 2003). Malgré l'intérêt évident de la mise en place du SNC chez les Céphalopodes d'un point de vue évolutif, les mécanismes moléculaires restent encore à établir.

2.2.2.2. Les lobes optiques et tissus associés

Comparés aux autres Mollusques, les Céphalopodes ont un mode de vie particulièrement actif. L'information visuelle provenant des yeux est considérable. Chaque lobe optique est presque aussi grand que le reste du cerveau et se compose d'environ 100 millions de cellules chez l'adulte. Les lobes optiques se situent de part et d'autre du cerveau et sont rattachés à la masse supra-œsophagienne par les tractus optiques. Ces tractus passent par les lobes pédonculaires, olfactifs et la glande optique.

Autour du lobe optique, se situe le corps blanc, un organe lymphoïde positionné de chaque côté, dans le sinus sanguin de l'orbite (fig. 11). Cette structure a une fonction globuligène ; les cellules sanguines, les amœbocytes ou leucocytes, y sont formés (Grassé, 1989 ; Nixon and Young, 2003).

Le tissu subpédonculé est issu de la partie centrale du lobe optique et constitue la principale zone neuroendocrinienne. Il s'agit d'un système de nerfs qui forment un neuropile sous l'épithélium de la veine cave, veine qui collecte le sang des bras, de la tête et de la partie antérieure de la masse viscérale. Les somas des neurones qui composent ce tissu sont situés dans des « troncs ganglionnaires », dans le lobe palléoviscéral. Le neuropile s'étend jusqu'à la veine cave et dans les veines adjacentes (Nixon and Young, 2003).

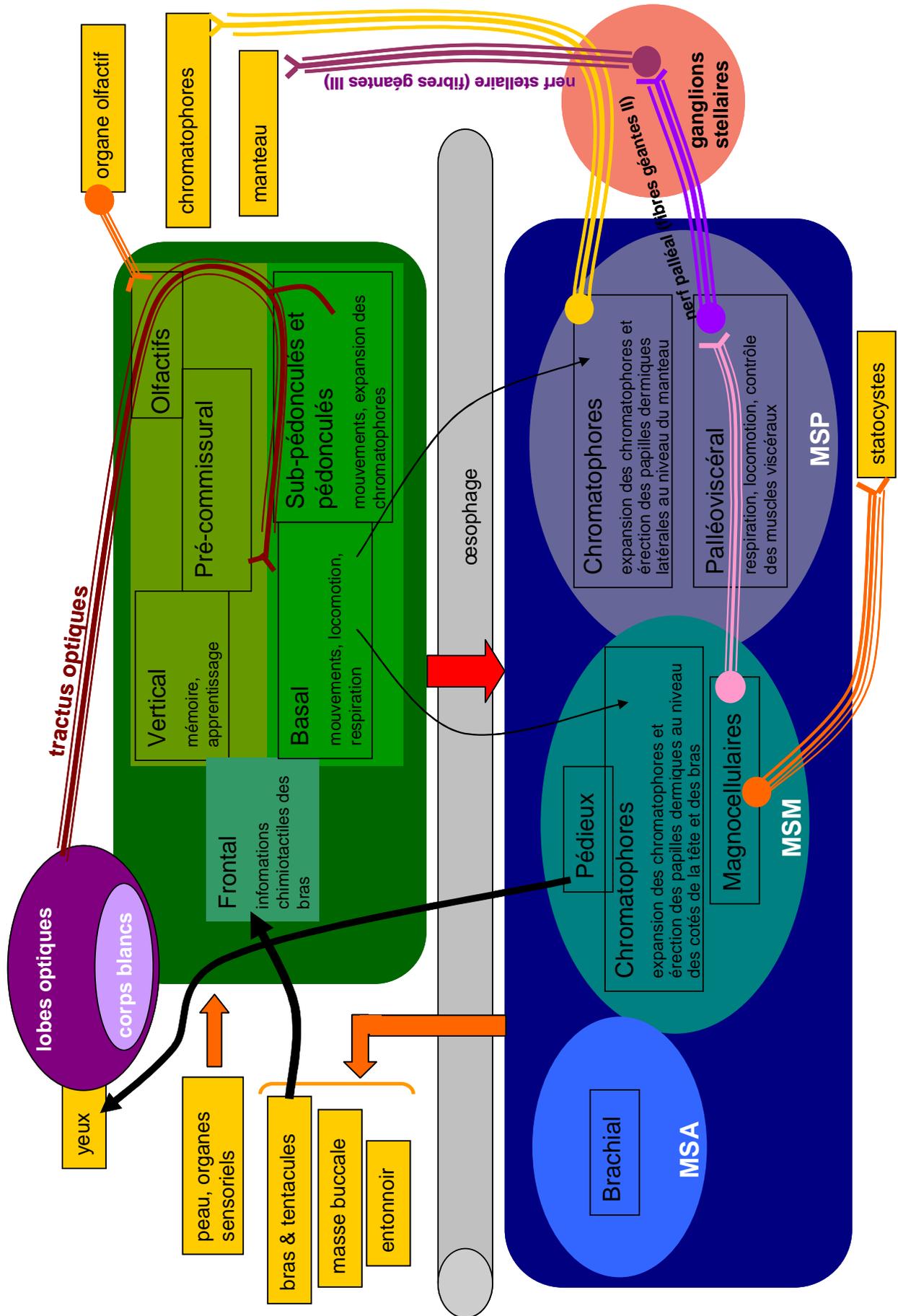


Figure 11 : Schéma représentatif du SNC de *S. officinalis* et des différents lobes le composant avec les principales connexions vers certains systèmes effecteurs. Ce schéma n'est bien entendu pas exhaustif concernant les connexions inter-lobes. MSA, masse sous-oesopagienne antérieure ; MSM, masse sous-oesopagienne moyenne ; MSP, masse sous-oesopagienne postérieure.

2.2.2.3. Rapport des différents lobes juvéniles/adultes

En 1971, Messenger a mis en place un protocole pour tester la capacité d'apprentissage de seiches adultes. Des proies enfermées dans un tube en verre étaient présentées aux seiches. Les seiches ont d'abord tenté de projeter leurs tentacules afin d'attraper les proies mais se sont heurtées au tube de verre. Pendant les 20 minutes de l'exercice, le nombre de tentatives de capture a baissé. Dans la deuxième expérience, les seiches recevaient un petit choc électrique à chaque tentative de capture. Cette expérience a montré que la baisse du nombre de tentatives de capture était directement liée à la quantité de chocs reçus lors des essais. Cela suggérait alors que l'inhibition de la projection des tentacules était liée à la douleur ressentie chaque fois que les tentacules touchaient le tube de verre. Après 24 heures, les proies étaient à nouveau présentées aux seiches dans un tube de verre. Les animaux n'ont pas tenté de projeter leurs tentacules, démontrant ainsi qu'elles avaient en quelque sorte « retenu la leçon ».

Des déficiences dans les processus d'acquisition ont été observées chez des seiches juvéniles comparées aux adultes. (Agin et al., 1998). Chez les juvéniles, les capacités de mémorisation augmentent pendant le développement post-embryonnaire précoce et tardif (Dickel et al., 1997, 1998). Ces changements développementaux sont liés à une maturation tardive des structures cérébrales associées à l'apprentissage visuel et à la mémoire. Il s'agit principalement du complexe du lobe vertical (Messenger, 1973). Le système du lobe vertical forme 6% du volume total du cerveau à l'éclosion, tandis qu'il forme près de 12% chez les seiches juvéniles (Frösch, 1971). Des activités intenses d'apprentissage pendant les 4 premiers mois de vie hors de l'œuf des petites seiches vont de pair avec un développement important de ce lobe (Messenger, 1973).

Il a également été montré que chez *S. officinalis*, les lobes basaux formaient 39% du volume total du cerveau à éclosion et seulement 26% chez un adulte (Frösch, 1971). Les lobes sont impliqués dans diverses activités dont la nage, la locomotion par propulsion et les mouvements de la tête, des bras, des tentacules et des nageoires. Les jeunes à l'éclosion sont très actifs. Ils nagent pour se maintenir dans la colonne d'eau et commencent à chasser immédiatement. Le volume important du lobe basal dans cette période clé du développement pourrait être en rapport avec l'activité intense nécessaire dès éclosion (Nixon and Mangold, 1998).

Contrairement à *Octopus vulgaris*, qui a un mode de vie planctonique à l'éclosion puis passe à un mode de vie benthique au stade adulte, les juvéniles de *S. officinalis* montrent les mêmes comportements que l'adulte dès l'éclosion (Boletzky, 1987). Les fondements de leur processus d'apprentissage seront donc les mêmes à tous les stades du développement post-embryonnaire. A l'éclosion, le lobe brachial est réduit, comparé au volume total du cerveau et chez *S. officinalis* et chez *O. vulgaris*. Il augmente ensuite en proportion au cours du développement post-embryonnaire. On note cependant une augmentation plus importante de ce volume pour *O. vulgaris*, concomitamment à une croissance considérable des bras et une augmentation massive du nombre de ventouses à la période du recrutement benthique. Les bras et ventouses ont des rôles plus complexes chez *O. vulgaris* comparé à *S. officinalis* lorsqu'ils passent en mode de vie benthique. Ainsi, cette phase de recrutement impose des modifications morphologiques auxquelles échappe *S. officinalis* dont le développement est, de ce fait, plus aisé à étudier, puisque affranchi de ce biais. Toute la masse sous-œsophagienne est cependant déjà disposée à l'éclosion des juvéniles de *S. officinalis*. Les structures nerveuses motrices sont déjà en place. C'est un facteur crucial pour rendre la locomotion possible dès l'éclosion.

Il semble donc que chez les Céphalopodes, les conditions post-embryonnaires jouent un rôle clé dans les processus de maturation de l'apprentissage et de la mémoire, tout comme il l'a été maintes fois observé chez les Mammifères et les Oiseaux (pour revue : Rosenzweig and Bennett, 1996). Par conséquent, la convergence anatomique et morphologique du cerveau des Céphalopodes avec celui des Vertébrés pourrait être associée à une convergence au niveau des mécanismes de développement de cet organe en relation avec l'environnement.

2.2.3. Le système nerveux périphérique

Le système nerveux périphérique (SNP) constitue environ 90% du système nerveux (Budelmann, 1995) ; il est concentré sur le système nerveux brachial (sensoriel et moteur), c'est-à-dire un ensemble de cordons neuraux associés aux nerfs sensoriels des ventouses. Le système nerveux périphérique montre d'autres particularités telles que des fibres géantes (ou axones géants) et des ganglions stellaires qui constituent un passage pour les nerfs des chromatophores. Les axones qui forment les nerfs périphériques sont pourvus de

gaines composées d'un nombre variable de couches, les cellules de Schwann (Young, 1967) qui assurent la myélinisation des axones.

Concernant le SNC, les différents lobes qui le composent fusionnent progressivement pendant le développement pour former le cerveau. Or, pour ce qui est du système nerveux périphérique, on observe plutôt une tendance à l'individualisation des ganglions, notamment, des deux ganglions stellaires, sur les côtés droit et gauche du manteau, mais également des ganglions brachiaux.

2.2.3.1. Le système nerveux brachial

Les bras comportent un axe nerveux central situé dans la musculature. Cet axe nerveux se compose de ganglions très rapprochés disposés en un cortex faisant chacun face à une ventouse. Le ganglion est constitué d'un neuropile et de cellules périphériques. A la base de chaque ventouse, se situe en plus un ganglion dit « acétabulaire » composé de quelques centaines de neurones. Ces ganglions sont des centres de réflexe périphériques pour les muscles de la ventouse (Graziadei, 1971) qui permettent une certaine autonomie du système brachial. De nombreux nerfs partent de chaque ganglion central. Il y a d'une part, les nerfs connectifs reliant l'axe central aux fibres nerveuses périphériques, au nombre de 6, et au ganglion acétabulaire et, d'autre part, on distingue un groupe de nerfs contenant des fibres motrices, allant vers les muscles, les chromatophores et diverses structures sensorielles, qui apportent des informations des récepteurs périphériques. Le réseau complexe de nerfs et de ganglions au sein même d'un unique bras, laissant supposer une autonomie de ce système, est pourtant évidemment connecté au SNC. Effectivement, du côté opposé aux ventouses, les parties externes et internes du cordon nerveux axial consistent en deux troncs composés de fibres efférentes et afférentes qui relient le cerveau et les bras. Il s'agit des tractus cérébrobrachiaux.

2.2.3.2. Les ganglions stellaires et le système de fibres géantes

Les ganglions stellaires sont au nombre de deux, de part et d'autre de l'axe de symétrie droite/gauche de l'animal (fig. 10). Ils sont positionnés sur la partie interne du

manteau. Chaque ganglion se compose d'environ 120 000 cellules nerveuses (Nixon and Young, 2003) et forme le plus important carrefour nerveux du système nerveux périphérique.

Le contrôle des muscles du manteau se fait par le système nerveux central via un système de fibres géantes faisant relais dans les ganglions stellaires. Des fibres de 1^{er} ordre partent du lobe magnocellulaire et font contact synaptique avec des fibres de 2^{ème} ordre dans le lobe palléoviscéral. Ces fibres de 2^{ème} ordre, appelées nerfs palléaux, font relais à leur tour dans les ganglions stellaires avec des fibres de 3^{ème} ordre, appelées nerf stellaire, qui innervent les muscles du manteau (fig. 10). Les nerfs stellaires contiennent aussi les fibres innervant les chromatophores. Ces fibres passent par les ganglions stellaires mais sans y établir de contact synaptique. Les zones innervées par les nerfs stellaires se recouvrent en partie (Boyle and Froesch, 1979). Cependant, aucun nerf du côté droit n'innerve une zone du côté gauche et inversement. Il n'y a pas de croisement de nerfs. Chaque nerf stellaire possède une racine ventrale exclusivement efférente et une racine dorsale composée à la fois de fibres efférentes et de fibres afférentes (Young, 1971). Le système de fibres géantes permet une conduction très rapide et assure une contraction globale et simultanée de toutes les fibres musculaires du manteau pour rendre possibles des mouvements de fuite rapides.

Il a été montré une expression de gènes *Hox* au niveau des ganglions stellaires à des stades 20/22 chez *Euprymna scolopes* (Lee et al., 2003). Des gènes de la même famille ont également montré des expressions au niveau des ganglions inter-brachiaux dans la couronne brachiale (Lee et al., 2003). Ce sont pour le moment les seuls gènes à avoir montré une expression dans les ganglions stellaires d'un Céphalopode.

2.2.3.3. Les statocystes

Les deux statocystes apparaissent sous la forme de deux structures circulaires de chaque côté du manteau au niveau de la naissance des deux parties du tube de l'entonnoir, côté ventral. Ces structures se transforment en vésicules et migrent sous la peau pour se positionner chez l'adulte en dessous du cerveau. Les canaux de Kölliker, vestiges de l'invagination de la vésicule, persistent en forme de cul-de-sac. La paire de statocystes est intégrée au cartilage crânien. Chaque statocyste contient des systèmes de récepteurs pour

la détection de la gravité ; il s'agit du système macula/statolithe et, pour la détection de l'accélération angulaire, du système crista/cupula (Budelmann, 1994). Il existe 3 maculae par statocyste. Il s'agit de zones condensant les cellules sensorielles. Elles sont en contact avec le statolithe. Le statolithe est une petite structure argonitique très dure qui se situe dans la cavité remplie de fluide. Le statolithe fait moins de 2 mm de long et présente des protubérances sur différents plans qui permettent d'estimer la croissance et l'âge de l'individu (Clarke, 1998).

2.2.3.4. Autres structures notables appartenant au système nerveux périphérique

L'organe olfactif

L'organe olfactif est logé dans la peau, derrière les yeux ; il est recouvert de microvillosités et de cils. L'épithélium pluristratifié de cet organe se compose d'un type de cellules épithéliales et de deux types de cellules sensorielles.

La ligne latérale

Il existe 8 lignes de cellules dermiques ciliées situées sur la tête de *S. officinalis*, 4 de chaque côté, continuant le long des bras. De chaque côté, deux lignes continuent dorsalement et deux autres ventralement (une au-dessus et une sous les yeux). Ces lignes sont formées de cellules ciliées dont les axones se dirigent dans le système nerveux central. Le nombre de cils peut varier de quelques-uns à plus de 100 par cellule. Chaque cil est polarisé morphologiquement vers une direction. La sensibilité de ces cellules permet à la seiche de détecter le mouvement d'un poisson d'un mètre de long à une distance de 30 mètres (Budelmann et al., 1991).

Les Téléostéens ainsi que certains amphibiens possèdent également des lignes latérales. Elles se présentent sous la forme d'une ligne, continue ou non, parcourant les flancs de l'animal. Cette structure permet la perception des vibrations de l'eau, et ainsi, entre autres, du son. Les récepteurs sur la ligne latérale sont appelés des neuromastes. Chacun de ces récepteurs présente une touffe de cils entourés d'une cupule gélatineuse (Popper and Platt, 1993). Chez la seiche et le calmar *Lolliguncula*, des expériences d'électrophysiologie ont permis l'identification de ces lignes épidermiques comme des

analogues aux lignes latérales mécanoréceptives des poissons. Cela constitue une nouvelle convergence entre les Céphalopodes et le système sensoriel des Vertébrés aquatiques (Budelmann and Bleckmann, 1988).

2.2.3.5. Les chromatophores

Les chromatophores sont des organes neuro-musculaires disposés sur la peau des Céphalopodes. Ils leur permettent de modifier leur couleur et ainsi de se camoufler dans leur environnement. Chaque cellule contenant le pigment est entourée d'une couronne de fibres musculaires radiaires. Lorsque les muscles se contractent, chaque cellule s'étire. Après la contraction des muscles et la dilatation de la cellule pigmentée, le sac à pigments élastique effectue un retour passif au repos. Les chromatophores sont reliés entre eux par un fin réseau horizontal de fibres radiaires. Ce sont les lobes des chromatophores de la masse sous-œsophagienne du cerveau qui commandent les muscles des chromatophores via les nerfs stellaires passant par les ganglions stellaires. Les lobes moteurs des chromatophores sont reliés par le lobe basal aux organes des sens, en particulier aux yeux, et à des récepteurs tactiles.

Le système de chromatophore est très développé chez les Octopodes, tandis que les Teuthidae (calmars) possèdent un nombre de chromatophores moins important. Il a été montré que les Céphalopodes pouvaient contrôler leurs patterns droit et gauche de chromatophores indépendamment (Maynard, 1967). Leur système nerveux périphérique est latéralisé et présente une symétrie droite/gauche évidente avec un axe bien défini morphologiquement.

Les chromatophores sont des structures neuro-musculaires et constituent donc une particularité majeure non seulement au niveau du système nerveux des Céphalopodes mais également au niveau de leur système musculaire. En effet, si les innovations morphologiques des Céphalopodes sont nombreuses pour ce qui est du système nerveux, elles le sont tout autant en ce qui concerne le système effecteur, le système musculaire.

2.3. Le système musculaire

La masse musculaire est très importante chez les Céphalopodes. Elle est composée en grande partie du manteau, du système brachial et de l'entonnoir, auxquels s'ajoutent les muscles viscéraux et cardiaques. Le système musculaire des Céphalopodes montre de nombreuses particularités, au niveau locomoteur comme au niveau cardiaque. Les Céphalopodes possèdent trois cœurs. Les deux cœurs branchiaux, situés à la base de chacune des branchies, pompent le sang du corps vers les branchies où il est oxygéné. Entre les cœurs branchiaux, le cœur systémique pompe le sang oxygéné des branchies vers le reste du corps. Les Céphalopodes montrent un système circulatoire clos, ce qui constitue une convergence importante avec les Vertébrés (Schipp, 1987 ; Wells and Smith, 1987). Ce système circulatoire est mis en place très tôt durant le développement de *S. officinalis* (Boletzky, 1987). En début d'organogenèse, les rudiments du cœur systémique sont déjà distincts morphologiquement dans la masse mésodermique. Dès que la fusion des rudiments a lieu, une cavité apparaît au sein du futur organe. En parallèle, des cavités apparaissent aussi dans la masse mésodermique à la base de chaque branchie. C'est le début de la différenciation des cœurs branchiaux. Les cœurs branchiaux, encore rudimentaires, commencent à pulser très vite après la formation des cavités. Le cœur systémique s'active un peu plus tard, après ses jonctions avec les cœurs branchiaux (Boletzky, 1987). La mise en place très précoce du système circulatoire va permettre une oxygénation optimale des muscles locomoteurs très tôt pendant le développement.

Différents types histologiques de muscles ont été décrits chez les Mollusques (Millman, 1967). Ils possèdent non seulement des muscles lisses et striés transversalement comme les Vertébrés, mais ils présentent en plus des muscles à striation oblique. Dans ce dernier type de muscles, les structures soutenant les filaments d'actine, (les « filaments fins » dans le muscle squelettique des Vertébrés) ne sont pas liées à des disques Z (matériel protéique auquel sont attachés les filaments d'actine chez les Vertébrés) continues (fig. 12). En outre, l'appareil contractile est organisé en structures rappelant des sarcomères de muscles striés transversalement mais ces « sarcomères » ne sont pas alignés latéralement. En effet, les disques Z sont alignés obliquement par rapport à l'axe longitudinal de la cellule (Gonzalez-Santander and Socastro Garcia-Blanco, 1972). Les muscles à striation oblique ne sont présents que dans quelques groupes de Métazoaires comme les Nématodes (Reger, 1964 ; Rosenbluth, 1965) ou les Annélides (Kawaguti and Ikemoto, 1957). Ce type

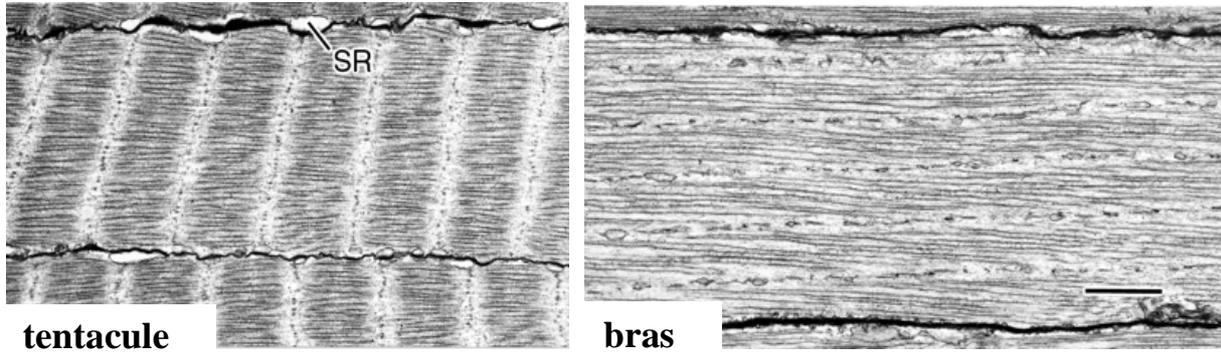
cellulaire est cependant connu depuis longtemps chez les Mollusques (Céphalopodes : Ballowitz, 1892 ; *Ostrea* : Marceau, 1904).

Chez les Céphalopodes, presque la totalité des muscles est striée obliquement. La présence de ce type de muscles dans le cœur systémique reste néanmoins encore discutée (Schipp and Schäfer, 1969 ; Budelmann, 1997 ; Kling and Schipp, 1987). Les tentacules seraient une des seules structures composées de muscles à striation transversale (Kier, 1985, 1991 ; Kier and Schachat, 2008). La mise en place des muscles striés dans le tentacule chez *Loligo pealii* se fait tardivement, 4 à 5 semaines après éclosion (Kier 1996). Ceci suggère que la striation transversale serait (évolutivement) secondaire par rapport à l'oblique chez les Céphalopodes, voire une « simple » convergence morphologique (Boletzky, 1993). Le manteau est composé par des muscles circulaires, radiaires et longitudinaux et constitue environ 30% du poids total de l'animal adulte (Trueman and Packard, 1968).

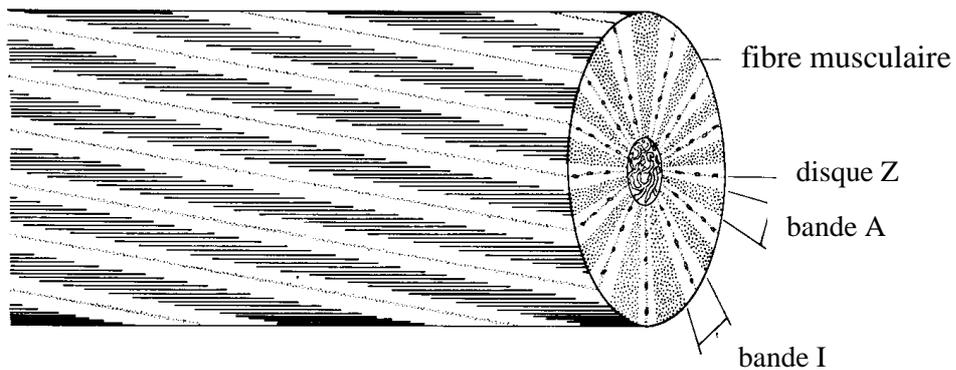
Les tentacules et les bras n'ont pas la même vitesse de contraction, ce qui a été relié à la différence de composition en muscles (Kier, 1992). D'un point de vue biochimique, les molécules impliquées seraient identiques, même si le cœur de paramyosine semble être plus important dans les muscles des bras que dans les tentacules (Kier, 1992). La rapidité de contraction est associée au raccourcissement de la structure contractile (longueur totale des sarcomères, longueur des filaments épais) des fibres striées (Kier, 1991).

Le contrôle moléculaire du développement musculaire chez les Céphalopodes n'a pas été exploré, tandis que chez les Vertébrés, on sait que le développement des muscles squelettiques à striation transversale dépend des MRFs (Myogenesis Regulating Factors). Les MRFs sont des protéines bHLH (basic Helix-Loop-Helix) qui activent la transcription de gènes spécifiques aux muscles à striation transversale (Buckingham and al., 2003 ; Tapscott, 2005). Grimaldi et al. (2004a ; 2004b) ont montré par immunomarquage la présence de Myf5 et MyoD-like au niveau de cellules musculaires dans les bras et tentacules d'embryons de *S. officinalis* du stade 26 à éclosion (grâce à des anticorps anti-MRF de Vertébrés).

a. *Loligo pealii*



b. muscle strié oblique



muscle strié transversal

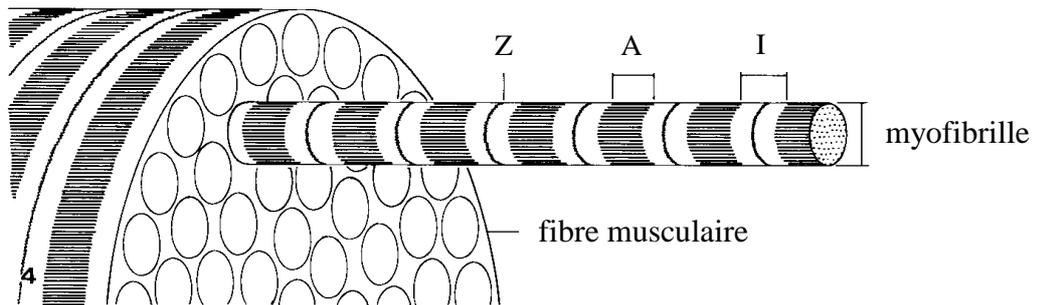


Figure 12 : **a.**: photos en microscopie électronique à transmission de sections transversales de muscles de *Loligo paelii*, SR, réticulum sarcoplasmique, échelle 1µm. **b.** : bas : schéma illustrant les différences entre les muscles striés obliquement et les muscles striés transversaux. Les bandes A correspondent aux filaments épais de myosine et les bandes I aux filaments fins d'actine. D'après Kier, 1985.

Le développement des muscles cardiaques ne dépend pas des MRFs mais de différents facteurs de transcription (Bruneau, 2002 ; Brand, 2003 ; Buckingham et al., 2005 ; Olson, 2006). Parmi eux, se trouve *NK4*. Il a été montré une expression de ce gène au niveau du cœur systémique et de la poche à encre à un stade 26 chez *Loligo pealii* (Elliott et al., 2006). En revanche, son pattern d'expression dans les stades précoces du développement embryonnaire des Céphalopodes n' a pas été établi.

Bien des spécificités des Céphalopodes, comme la présence d'un système nerveux centralisé et hiérarchisé, constituent des convergences majeures avec les Vertébrés. Nous cherchons les limites de ces similitudes, à savoir, si les mécanismes moléculaires sous-jacents sont identiques ou, au contraire, totalement différents de ce qui est connu actuellement chez les modèles Vertébrés et Ecdysozoaires.

La coordination des mouvements locomoteurs va dépendre du positionnement des muscles, lequel positionnement dépend à son tour de la myogenèse répondant à l'action commune de nombreux gènes et cascades moléculaires pendant le développement embryonnaire. Le cerveau, en liaison étroite avec les muscles locomoteurs, va être le centre contrôle de la coordination musculaire. Pour comprendre de quelle façon se met en place le système locomoteur, il faut cibler non seulement des gènes intervenant potentiellement dans la mise en place musculaire, mais il est également indispensable d'étudier la manière dont le système nerveux va s'organiser et se positionner en liaison avec la fonction de locomotion.

Pour répondre à ces problématiques, une démarche possible consiste à cibler des gènes connus dans d'autres groupes pour intervenir dans la mise en place du système neuro-musculaire. Il s'agit principalement de gènes à homéodomains, codant pour des facteurs de transcription essentiels lors de la mise en place du plan d'organisation. Ces gènes interviennent pour certains dans la voie *sonic Hedgehog* et appartiennent aux familles des gènes *NK* et *Pax*.

3. Gènes d'intérêt

Deux familles de gènes sont étudiées pour leur rôle connu dans d'autres groupes de Métazoaires dans la mise en place des territoires nerveux et musculaires : les gènes du cluster *NK* et les gènes de la famille *Pax*.

Les gènes *Pax* codent des facteurs de transcription « spécialisés » au cours de l'organogenèse. La famille *Pax* comprend neuf protéines divisées en quatre groupes sur la structure de leurs domaines (paired-domain, homéodomaine et octapeptide). Chez les Vertébrés, les gènes *Pax2*, *Pax5*, *Pax6*, et *Pax8* interviennent dans la mise en place du SNC (Matsunaga et al., 2000 ; Lang et al., 2007), les gènes *Pax3* et *Pax7* dans celle des muscles squelettiques (Buckingham et al., 2005).

Les gènes du cluster *NK* sont des gènes à homéoboîte codant des facteurs de transcription. Six classes de gènes organisés en cluster ont été définies chez les Mammifères et la drosophile. Parmi ces gènes, *NK4* a un rôle dans la mise en place de tissus d'origine mésodermique chez la drosophile et les Vertébrés (Garcia-Fernandez, 2005) ; il participe, entre autres, à la formation des tissus vasculaires et du cœur (Holland et al., 2003 ; Ryan et al., 2007). *NK2* et *NK6* sont impliqués dans des mécanismes de différenciation de neurones, dans la corde spinale mais aussi dans le SNC chez les Vertébrés. Le gène *shh* (*sonic hedgehog*) est impliqué en amont de *NK2* (Briscoe et al., 1999 ; Cordes, 2005). Pour comprendre la mise en place et l'évolution des structures impliquées dans la locomotion chez les Céphalopodes, nous avons choisi d'étudier ces gènes « clés » chez la seiche.

3.1. La voie *sonic hedgehog*

La famille des protéines Hedgehog (Hh) est largement distribuée au sein des métazoaires. Un unique gène *hh* a été découvert chez *Drosophila melanogaster* (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980), chez laquelle une mutation sur ce gène conduisait à un embryon couvert de petits denticules (d'où le nom « hedgehog » qui signifie « hérisson »). Chez les Vertébrés, des duplications ont donné naissance à plusieurs gènes *Hh*. Trois ont été caractérisés chez les mammifères, *sonic hedgehog* (*shh*), *indian hedgehog* (*Ihh*) et

desert hedgehog (dhh) (Marigo et al., 1995 ; Katoh et Katoh, 2006). Parmi ces gènes, *shh* est le ligand le plus étudié de la voie de signalisation *hedgehog*. Il joue des rôles clés dans l'organogenèse et l'organisation du cerveau chez les Vertébrés (Traiffort et al., 2010).

Il s'agit d'un morphogène, une molécule qui diffuse pour former un gradient qui aura différents effets suivant sa concentration. Chez les Vertébrés, il possède un rôle majeur « ventralisant » dans la mise en place de l'axe neural à des stades très précoces (McMahon et al., 2003). Au niveau de la corde neurale, SHH, produit au niveau ventral, régule les différents domaines d'expression de facteurs de transcription. Un gradient important de SHH active l'expression de gènes dits de classe I, dont fait partie *NK2*, et inhibe celle de classe II, qui inclut *Pax6* tandis qu'un gradient faible permet l'expression de *Pax6* (Ericson et al., 1997a). SHH définit différents domaines « NK2 positifs » au niveau ventral et « PAX6 positif » au niveau dorsal, et détermine ainsi les sous-types neuronaux, motoneurones et interneurones, dans chaque zone (Warren et al., 1999 ; Jacob and Briscoe, 2003) (fig. 13).

SHH présente également un rôle chimioattractant pour les axones en croissance, notamment au niveau du tube neural (Charron et al., 2003). Pendant le développement des Vertébrés, les membres de la famille de *Shh* sont exprimés dans une large variété de tissus qui inclut la notochorde, le plancher neural et le cerveau antérieur ventral (Camus et al., 2000 ; Barth and Wilson, 1995 ; Echelard et al., 1993). Chez les Ecdysozoaires tel que *Drosophila*, *hedgehog* est nécessaire pour l'initiation de la prolifération des neuroblastes dans le cerveau larvaire (Park et al., 2003). Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, aucun gène homologue à *hedgehog* n'a pu être caractérisé (Bürglin and Kuwabara, 2006). Chez les Lophotrochozoaires, *shh* a montré une expression dans des cellules nerveuses (Kang et al., 2003), corroborant en partie ce qui est observé chez les Vertébrés et la drosophile. En effet, chez la sangsue *Helobdella robusta*, l'homologue de *shh*, *Hro-hh*, est exprimé dans un petit groupe de neurones ganglionnaires dans l'embryon, mais également au niveau des parois du corps, du système digestif antérieur et postérieur et dans les organes reproducteurs (Kang et al., 2003). Quant aux Mollusques, dans la larve trochophore de la patelle *Patella vulgata*, *hedgehog* est exprimé le long de la ligne médiane ventrale (Nederbragt et al., 2002) et chez l'Annélide *Capitella* sp., l'homologue du gène *hh* (*CapI-hh*) est exprimé dans divers tissus dont un sous-groupe de neurones de la chaîne nerveuse ventrale (Seaver and Kaneshige, 2006). Les Céphalopodes ne possédant pas de cordon nerveux ventral mais une cérébralisation poussée, les mécanismes de

différenciation cellulaire et de polarisation, et le rôle de *shh*, dont peu de données d'expression sont disponibles chez d'autres Mollusques, doivent être explorés. Le signal "hh-like" observé dans une population spécifique de myoblastes chez des stades avancés de *S. officinalis* (Grimaldi et al., 2008) ne permettent pas d'inférer sur son rôle au niveau du SNC et sur la similitude (ou non) des expressions et mécanismes observés chez les autres Lophotrochozoaires étudiés, ou encore, chez les Vertébrés.

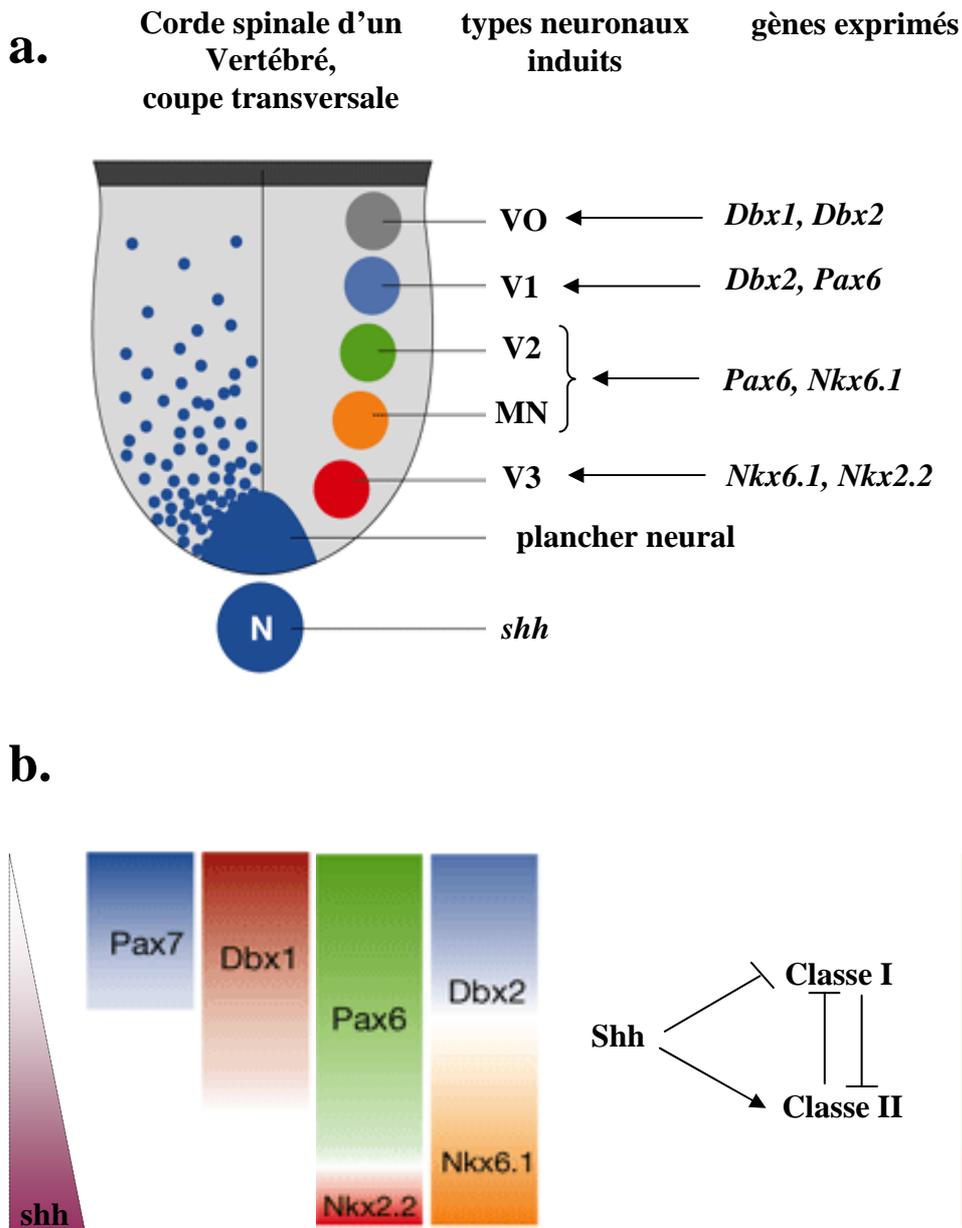


Figure 13 : a. : schéma représentant une section transversale de la corde spinale d'un Vertébré, des sous-types neuronaux résultent de domaines progéniteurs définis par l'expression de gènes spécifiques. b. : le gradient de concentration de SHH à partir du côté ventral régule l'expression d'une série de facteurs de transcription. SHH inhibe l'expression de gènes de classe I et active celles de classe II. Des boucles de régulations négatives permettent le maintien des domaines d'expression. MN, motoneurones ; N, notochorde ; V0–V3, interneurons ventraux 0–3. D'après Jacob et Briscoe, 2003.

3.2. Les gènes *NK*

Les gènes *NK* forment un cluster, c'est-à-dire un groupe de plusieurs gènes situés sur un même chromosome, proches les uns des autres, apparus par duplication. Ils ont d'abord été caractérisés chez la drosophile (Nirenberg and Kim, 1989). Ils auraient pour origine le mégacluster ANTP, pour « Antennapedia », de même que les gènes *Hox* et *ParaHox* (Garcia-Fernandez, 2005). Des duplications (et/ou recombinaisons) au cours de l'évolution des Métazoaires auraient conduit à différents états de clusterisation et de dispersion des gènes dans les différentes lignées ; certains de ces gènes acquérant de nouvelles fonctions. On trouve des homologues chez tous les Métazoaires. Il a été montré que le cluster *NK* était formé d'au moins 5 gènes chez le dernier ancêtre commun des Spongiaires, Cnidaires et Bilateria (Larroux et al., 2007). Le nombre de gènes par cluster varie selon les taxa. Chez la drosophile, les gènes *Nk1*, *Nk2*, *Nk3* et *Nk4* nommés respectivement *S59*, *vnd* (ventral nervous system defective), *bap* (bagpipe), *tinman*, ainsi que le gène *ladybird*, ont été identifiés.

Les gènes *NK* sont des gènes à homéodomaine de 60 acides aminés (Gehring et al., 1994) qui montrent un domaine EH1, répresseur essentiel pour l'interaction avec un co-répresseur transcriptionnel TLE/Groucho (Bae et al., 2004). Ces gènes ont un rôle crucial dans le développement. Ils informent les cellules de leur disposition au cours de l'embryogenèse et précisent leur positionnement définitif dans l'embryon au cours de la formation des organes par rapport aux axes antéro-postérieur et dorso-ventral. Certains d'entre eux gouvernent le développement du système nerveux, l'organisation du futur cerveau et de la corde spinale chez les Vertébrés. C'est le cas pour *Nk1*, *Nk2*, *Nk6* et *ladybird* qui ont montré des rôles dans la mise en place du système nerveux chez la drosophile et les Vertébrés. Chez les Céphalopodes, ont été recensés uniquement *NK4*, *ladybird*, *NK1* et *NK2* (Elliott et al., 2006). Il s'agissait pour nous de déterminer les patterns d'expression de ces gènes essentiels dans la mise en place et l'organisation du système nerveux chez toutes les espèces étudiées jusqu'à présent.

3.2.1. *NK2 et NK6*

Chez les Vertébrés, *Nk2* et *Nk6* ont tous deux des rôles dans la neurogenèse. *Nk6* aurait pour fonction ancestrale de promouvoir le développement des motoneurones (Cheesman et al., 2004). Chez les Vertébrés, ce gène a un rôle critique dans la spécification des motoneurones dans la corde spinale. Les protéines *Nkx6* guident la croissance des axones et contrôlent l'identité des neurones oculomoteurs au niveau du cerveau moyen de la souris (Müller et al., 2003).

Chez la drosophile, *NK2.1/Scarecrow* est exprimé dans le pharynx en développement (Zaffran et al., 2000). Chez les Vertébrés, *Nkx2.1* est impliqué dans le développement de la thyroïde et des poumons, deux structures dérivées du tube digestif (Minoo et al., 1999) et chez le Lophotrochozoaire Annélide *Platynereis*, le gène est exprimé dans le bulbe buccal (Tessmar-Raible et al., 2007). En ce qui concerne *NK2.2*, son implication dans la mise en place du système nerveux central est très importante au sein du règne animal. En effet, Chez la drosophile, le système nerveux central se développe à partir de trois colonnes longitudinales de cellules ventrales qui expriment le gène *vnd*, homologue de *Nkx2.2* (Weiss et al., 1998). Chez le Lophotrochozoaire *Platynereis*, Denes et al. (2007) ont montré une expression au niveau du neuroectoderme ventral complémentaire à celle de *Pax6*.

Les gènes *NK2* et *NK6* sont également impliqués dans une voie de signalisation permettant la détermination des zones dopaminergiques et sérotoninergiques du cerveau moyen des Vertébrés (Prakash and Wurst, 2006). Ces mécanismes sont sous la dépendance d'une cascade transcriptionnelle impliquant une activation de *NK6* par *NK2* (voie sérotoninergique) ou une inhibition des gènes *NK2* et *NK6* (voie dopaminergique) (Prakash and Wurst, 2006). Il a été montré chez *Platynereis* que la première paire bilatérale de neurones sérotoninergiques dans le système nerveux central émerge d'un précurseur *NK2* (Denes et al., 2007). Les voies semblent donc similaires à celles des Vertébrés où de multiples populations de neurones sérotoninergiques se différencient du domaine neuronal du cerveau moyen exprimant *Nk2*. Ils envoient des projections ascendantes dans le cerveau antérieur et des projections descendantes dans la corde spinale pour moduler l'activité locomotrice spontanée. Il existe donc différents rôles pour des gènes homologues et ce, à différents stades du développement.

Chez les Céphalopodes comme chez les Vertébrés, les systèmes sérotoninergiques et dopaminergiques auraient un rôle clé dans la modulation des comportements et les fonctions cognitives (pour la sérotonine) et dans le contrôle des mouvements volontaires, donc, de la locomotion (pour la dopamine) (Williamson and Chrachri, 2007). En plus d'un rôle chez l'adulte, ces systèmes sont identifiés dans les embryons ou larves de tous les groupes animaux, montrant leur rôle putatif dans la neurogenèse du SNC. L'étude de ces systèmes permet ainsi d'apporter des éléments de réponses sur les mécanismes de la mise en place de la territorialité fonctionnelle du SNC.

3.2.2. *NK4*

Contrairement aux gènes *NK2* et *NK6* intervenant principalement dans des tissus d'origine ectodermique, le gène *NK4*, issu probablement d'une duplication de *NK2*, a montré un rôle au niveau des tissus mésodermiques, notamment dans le développement cardiaque chez de nombreuses espèces (Elliott et al., 2006 ; Harvey, 1996). De plus, la fonction de ce gène semble être bien conservée. Il définit un contexte « cardiaque » pour les processus transcriptionnels intervenant dans le développement cardiaque (Mann and Carroll, 2002). L'homologue de *NK4* chez les Vertébrés, *Nkx2-5* (Lints et al., 1993), est impliqué dans le développement cardiaque (Akazawa and Komuro, 2005 ; Cripps and Olson, 2002). *Tinman*, l'homologue chez la drosophile (Kim and Nirenberg, 1989), est impliqué dans la régionalisation du mésoderme et dans le développement cardiaque (Bodmer, 1993 ; Bodmer et al., 1990). Chez *Caenorhabditis elegans*, l'homologue de *tinman*, *ceh-22*, est impliqué dans le développement du muscle pharyngien (Okkema and Fire, 1994 ; Okkema et al., 1997) ; ce muscle est responsable des contractions rythmiques intrinsèques du pharynx et sont de ce fait considérés comme les homologues physiologiques des muscles cardiaux des Vertébrés (Pilon and Morck, 2005). Chez le calmar *Loligo pealii*, le gène homologue de *NK4* s'exprime au niveau du cœur systémique et dans le sac d'encre chez un stade tardif d'embryon de *Loligo pealii* (Elliott et al., 2006).

3.3. Les gènes *Pax*

Les gènes *Pax* forment une grande famille de facteurs de transcription qui jouent des rôles clés au niveau du développement embryonnaire chez tous les Métazoaires. La caractéristique principale de cette famille est la présence d'une « paired-box » de 384 pb qui code pour un domaine de liaison à l'ADN de 128 acides aminés (Noll, 1993). Les gènes *Pax* sont divisés en groupes fondés sur l'absence ou la présence d'un domaine paired, d'un homéodomaine et d'un octapeptide. L'homéodomaine constitue un autre domaine de liaison à l'ADN, tandis que l'octapeptide est un domaine de liaison à des molécules inhibitrices de la transcription, telles que groucho (Lang et al., 2007). On distingue 4 groupes : le groupe I, comprenant *Pax1* et *Pax9*, présente un domaine paired, un octapeptide mais pas d'homéoboîte ; le groupe II *Pax2*, *Pax5* et *Pax8*, contient les 3 domaines, avec un homéodomaine tronqué ; le groupe III, *Pax3* et *Pax7*, présente également les trois domaines mais l'homéodomaine n'est pas tronquée ; enfin, les groupes IV, *Pax1* et *Pax4*, montre un domaine « paired » et un homéodomaine mais pas d'octopeptide (Walther and Gruss, 1991). Ces différents groupes sont en fait le reflet des gènes d'origine qui se seraient ensuite dupliqués chez les Vertébrés. Les Vertébrés sont le premier groupe chez lequel ces gènes ont été identifiés. De ce fait, la terminologie (numérotation des gènes) ne suit pas les groupes ancestraux. La majorité de ces groupes sont conservés chez les Protostomiens, chez lesquels on retrouve les gènes *Pax2/5/8* (Arthropode : Czerny et al., 1997 ; Gastropode : O'Brien and Degnan, 2003), *Pax3/7* (Arthropode : Gutjahr et al., 1993 ; Annélide : Denes et al., 2007) et *Pax4/6* (Arthropode : Quiring et al., 1994 ; Mollusque : Hartmann et al., 2003). Le groupe I comprenant *Pax1/9* n'a été caractérisé que chez les Ecdysozoaires (drosophile : Bopp et al., 1989). Chez les Vertébrés, ils sont donc 9 gènes, de *Pax1* à *Pax9*, tous exprimés au niveau du SNC, à l'exception de *Pax1* et *Pax9*, exprimés principalement au niveau du squelette et *Pax4*, exprimé dans le tube digestif (Lang et al., 2007). Nous nous intéresserons donc principalement à *Pax6* et *Pax2/5/8*, mais également à *Pax3/7* pour leurs expressions putatives dans les structures nerveuses et musculaires cibles.

3.3.1. *Pax6*

Le gène *Pax6* joue un rôle développemental comme le « gène maître » dans la régulation de la mise en place des organes photosensibles chez divers métazoaires (Gehring and Ikeo, 2008). Chez les Vertébrés, *Pax6* est exprimé dans le système nerveux central en développement dans plusieurs structures optiques (souris : Walther and Gruss, 1991 ; poisson-zèbre : Krauss et al., 1991 ; poule : Li et al., 1994). Chez *Drosophila*, le gène homologue de *Pax6*, *eyeless*, est exprimé pendant le développement des yeux et du système nerveux central, plus particulièrement, dans les neuroblastes de la chaîne nerveuse ventrale (Quiring et al., 1994). Le gène *Pax6* fait partie des gènes dits de « classe II » inhibés par de fortes concentrations du morphogène SHH ; il participe ainsi à la différenciation de classes de neurones spécifiques au niveau dorsal dans la corde nerveuse des Vertébrés (Jacob and Briscoe, 2003).

Pax6 a également été identifié chez les Annélides et les Mollusques, dont les Céphalopodes, et pourrait avoir un rôle dans les structures sensorielles périphériques et certaines parties du cerveau tel que les lobes olfactifs et optiques (*Loligo opalescens* : Tomarev et al., 1997 ; *Euprymna scolopes* : Hartmann et al., 2003).

Pax6 et *shh* jouent des rôles cruciaux dans l'établissement du système nerveux et la complémentarité dorso-ventrale de leurs expressions a été montrée chez des Vertébrés, mais pas encore chez des Lophotrochozoaires.

3.3.2. *Pax2/5/8*

Le gène *Pax2/5/8* est associé avec le développement mécanosensoriel chez les Mammifères (Torres et al., 1996), les Téléostéens (Pfeffer et al., 1998), la drosophile (Czerny et al., 1997) et les Gastropodes (O'Brien and Degan, 2003), tandis que chez les Cnidaires, l'homologue de *Pax2/5/8* est associé avec la différenciation des cellules nerveuses et sensorielles (Gröger et al., 2000).

Les gènes *Pax2/5/8* se sont dupliqués de façon indépendante dans différentes lignées de Chordés. Au sein des Vertébrés, les Tétrapodes ont 3 membres pour la famille *Pax2/5/8* : *Pax2*, *Pax5* et *Pax8*. Les Téléostéens ont en plus des gènes *Pax2* dupliqués (Pfeffer et al., 1998). Contrairement aux Vertébrés, l'amphioxus possède un seul gène *Pax2/5/8* présentant le même pourcentage d'homologie par rapport à *Pax2*, *Pax5* et *Pax8*

(Kozmic et al., 1999) et les Urochordés ont deux gènes *Pax2/5/8*, *Pax2/5/8a* et *Pax2/5/8b* (Wada et al., 2003).

Chez les Vertébrés, *Pax2*, *Pax5* et *Pax8* sont exprimés au niveau du cerveau postérieur. Ces gènes sont connus pour avoir un rôle au niveau de la limite cerveau moyen-cerveau postérieur (Rowitch and McMahon, 1995). Ils participent en effet à la régionalisation cérébrale. Les gènes *Pax2/5/8* sont également exprimés dans la corde spinale ainsi que dans diverses structures sensorielles. *Pax2*, par exemple, est exprimé au niveau des yeux et des placodes otiques (Torres et al., 1996 ; Favor et al., 1996) tandis que *Pax5* a un rôle au niveau de la mise en place du système immunitaire, dans la lymphopoïèse des cellules B (Nutt et al., 1997). Quant à *Pax8*, le gène présente également une expression au niveau de la thyroïde (Trueba et al., 2005). La diversité des rôles de ces gènes ayant pour origine un même gène ancestral reflète les phénomènes de sous-fonctionnalisation qui ont pu avoir lieu après duplication.

Chez la drosophile, une expression de l'homologue de *Pax2/5/8* a été détectée chez des embryons à des stades très précoces sous forme de patterns réguliers au niveau de chaque hémisegment. Le gène s'exprime également dans des structures sensorielles variées comme dans les organes sensoriels antennaires et labiaux (Czerny et al., 1997).

En ce qui concerne les Mollusques, les patterns d'expression de *Pax2/5/8* n'ont été établis que chez une espèce de Gastropode (avec métamorphose), *Haliothis asinina* chez lequel il a été montré une expression au niveau des statocystes et d'autres structures chimiosensorielles et mécanosensorielles pendant le développement du Gastropode. *Pax2/5/8* pourrait avoir un rôle conservé dans la formation de structures responsables de l'équilibre et de la géotaxie chez les Eumétazoaires (O'Brien and Degan, 2003).

3.3.3. *Pax3/7*

Les gènes *Pax3* et *Pax7* qui forment le groupe III de la famille des gènes *Pax* sont associés au développement mésodermique chez de nombreuses espèces. Ils sont également exprimés au niveau des tissus nerveux chez les Vertébrés. En effet, ils sont impliqués dans la spécification des crêtes neurales (Goulding and Paquette, 1994) mais sont aussi exprimés dans les somites, lors du développement d'embryons Vertébrés où ils sont impliqués dans la myogenèse (Goulding et al., 1991). Les facteurs de transcription *Pax3* et

Pax7 seraient des régulateurs importants de l'expression de facteurs de transcription spécifiques aux muscles, *Myf5* et *MyoD* (Relaix et al., 2005).

Chez la drosophile, les gènes homologues à *Pax3/7* sont au nombre de trois : *paired* (*prd*) (Kilchherr et al., 1986), *gooseberry* (*gsb*) et *gooseberry-neuro* (*gsbn*) (Gutjahr et al., 1993). Le gène *prd* serait indispensable au bon établissement de l'axe antéropostérieur dans l'embryon de Drosophile (Kilchherr et al., 1986). Il a été montré que le gène *gooseberry* était strictement exprimé dans les couches germinales ectodermiques, en bandes caractéristiques de polarisation des segments lors de la gastrulation. Son expression s'étend ensuite aux tissus mésodermiques (Gutjahr et al., 1993). *Gooseberry* serait impliqué dans le maintien de l'expression du gène *wingless* et serait donc indispensable au déterminisme et à la polarisation cellulaires lors du développement (Li and Noll, 1993).

Chez les Lophotrochozoaires, des homologues ont été identifiés chez des Annélides uniquement. Chez la sangsue *Helobdella*, deux gènes ont été caractérisés : *Hau-Pax3/7A* et *Hau-Pax3/7B*. *Hau-Pax3/7A* serait un marqueur moléculaire précoce du feuillet mésodermique de l'embryon de sangsue (Woodruff et al., 2007). Denes et al. (2007) ont décrit l'expression de *Pax3/7* dans le neuroectoderme latéral de *Platynereis dumerilii*. L'expression de *Pax3/7* et celle de *Pax6* se superposent comme cela a été montré dans le tube neural des Vertébrés (Pattyn et al., 2003). Le gène *Pax3/7* n'a jusqu'ici jamais été caractérisé chez un autre Mollusque.

3.4. *Nodal*

Le gène *Nodal* fait partie de la super famille des *TGF beta*. Comme tous les membres de cette famille, il est impliqué dans la différenciation cellulaire. Chez l'embryon de poulet, il a été montré que SHH induisait l'expression du gène *Nodal* du côté gauche de l'embryon au niveau du nœud de Hensen (Levin et al., 1995). Chez la souris, *Nodal* est essentiel à la formation du mésoderme ; il est impliqué dans l'organisation de l'axe de symétrie droite/gauche pendant le développement embryonnaire précoce. Des souris invalidées pour ce gène meurent très vite après la gastrulation (Reissmann et al., 2001). L'axe de symétrie droite/gauche des Vertébrés est établi par un processus impliquant les gènes *Nodal* et *Lefty*. *Nodal* est exprimé dans la partie gauche de l'organisme (Hamada et

al., 2002). *Nodal* est le premier gène à être exprimé de façon asymétrique, tout d'abord dans le nœud embryonnaire, ensuite dans le mésoderme gauche. Chez l'oursin, *Nodal* régule également l'asymétrie droite/gauche mais de façon inversée, comparé aux Vertébrés. En effet, les signaux sont émis par le côté droit de la larve (Duboc et al., 2005). Un orthologue du gène a été caractérisé chez un Mollusque Gastropode, *Lottia gigantea*, et a montré un rôle dans l'établissement de l'asymétrie droite/gauche également (Grande and Patel, 2009). Ce gène pourrait être un des acteurs dans la mise en place de la bilatéralité chez les Céphalopodes.

Au cours du développement, les fenêtres d'action moléculaires sont très courtes quel que soit l'organisme concerné. Les familles de gènes, à multiples fonctions telles que celles citées plus haut, sont donc de première importance. Mais de quelle(s) façon(s) ces gènes vont-ils intervenir au cours du développement d'un Céphalopode, *S. officinalis*, présentant tant de synapomorphies au sein des Mollusques et de nombreuses convergences avec les Vertébrés ? La majorité de ces gènes, et notamment, le système *shh/Pax6/NK2*, sont exprimés au sein de la corde nerveuse des Vertébrés. Chez les Céphalopodes, les mécanismes de mise en place du système nerveux échappent à ce système clé en l'absence de cordon nerveux central. Une autre structure a-t-elle pu la remplacer dans ce rôle ? La présence d'une telle structure est-elle une nécessité ? Comment ces mécanismes moléculaires ont-ils été impliqués dans le processus d'adaptation à de nouveaux modes de vie, dont la locomotion est une des fonctions primordiales ?

La fonction de locomotion fait intervenir les muscles sous le contrôle du système nerveux central. Deux processus majeurs du développement seront donc considérés : d'une part, la spécification et détermination neuronale ; d'autre part, la myogenèse et le lien neuro-musculaire.

Matériel et méthodes

Pour appréhender la manière dont le complexe neuro-musculaire se met en place, la démarche consiste à étudier des gènes candidats connus dans d'autres groupes pour intervenir lors du développement des systèmes nerveux et musculaires. L'étape de caractérisation de gènes candidats s'effectue par une approche classique de PCR, RT PCR. Cette étape a été nettement facilitée par l'obtention récente d'une banque d'ESTs (Expressed Sequences Tags) réalisée à partir d'un pool d'embryons de différents stades de *Sepia officinalis* dans le cadre d'un projet Génoscope/CEA. L'étude du pattern d'expression au cours du développement par hybridations *in situ* (HIS) permet ensuite de cerner les rôles de ces gènes. Enfin, les études expérimentales par balnéation en présence d'inhibiteurs de voies moléculaires spécifiques et injections permettent de mieux comprendre les fonctions de certains de ces gènes. Dans ce chapitre, seront donc décrits de façon plus précise les différents protocoles utilisés lors de mes recherches.

1. Matériel biologique

Pendant le printemps et l'automne (d'avril à septembre), les œufs sont pondus par des femelles *Sepia officinalis* gardées dans les stations biologiques de Luc-sur-mer (Université de Caen), Banyuls-sur-mer et Roscoff (UPMC). Les œufs sont maintenus en eau de mer avec des bulleurs, à une température d'environ 19°C. Le développement a lieu à l'intérieur du chorion, une membrane produite par l'œuf et qui entoure celui-ci. Dans ces conditions, le développement est normal, comme vérifié par le timing et l'aspect morphologique des embryons. Les œufs sont détachés individuellement et les embryons sont retirés de leurs

membranes à l'aide de pinces plongées dans de l'eau de mer. Le stade de chaque embryon est défini d'après le système de Lemaire (1970) pour *Sepia officinalis*. Le chorion est conservé pour les stades précoces, 15 à 22. Une partie des embryons est fixés en RNA later® en vue des extractions d'ARN. Une autre partie est traitée pour être utilisée en hybridations *in situ* (HIS) *in toto*. Le focus étant porté sur l'organogenèse, des embryons des stades 15 à 30 sont fixés. Les embryons sont fixés une nuit avec leur chorion dans du paraformaldehyde (PFA) 3,7% en tampon phosphate salin (PBS). Ils sont ensuite déchorionnés et une deuxième opération de fixation est pratiquée (PFA 3,7%, 4°C, 24h). Après 3 rinçages en PBS 1x, les embryons utilisés pour les HIS *NK4*, *Shh* et *Pax6* sont déshydratés dans des concentrations croissantes de méthanol (25% à 100%). Les embryons utilisés pour les HIS *Pax258* ont été fixés en PBS1x/glycérol 20%. Tous sont conservés à -20°C.

2. Extraction d'ADN

Les extractions d'ADN sont réalisées à partir d'environ 30 mg de tissus de Céphalopodes adultes avec le Kit DNeasy Tissue® de QIAgen. Le tissu est broyé dans un tampon de lyse, auquel est ajoutée la protéinase K afin de « libérer » l'ADN. Une incubation à 55°C toute la nuit permet une digestion complète du tissu. L'ADN est récupéré sur colonne et une précipitation est effectuée à l'éthanol absolu. La réussite des extractions est vérifiée par amplification de l'ADN mitochondrial 16S via une PCR avec les amorces correspondantes. Le protocole est décrit précisément en annexe 3.

3. Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN est fondée sur la solubilité différentielle des molécules (acides nucléiques / contaminant) entre deux phases non miscibles. Les extractions d'ARN se font au Tri Reagent®, du trizol, une solution phénolique, à partir d'un morceau de tissu. Cette solution sert à débarrasser les acides nucléiques des protéines, le phénol étant un déprotéinisant puissant. Suit une extraction au chloroforme, qui complète toujours l'extraction précédente pour éliminer toutes traces de phénol. Une centrifugation permet la

séparation de l'ARN et du phénol chloroforme. La phase aqueuse contient l'ARN qui est précipité et repris dans de l'eau traitée. Une vérification de l'état de pureté des ARN se fait par lecture de la densité optique (DO) à 260 nm et calcul du rapport de DO 260/280. Le protocole en intégralité se trouve en annexe 4.

4. Amplification des acides nucléiques

4.1. Transcription inverse

La transcription est la réaction de synthèse d'ARN avec comme matrice un brin d'ADN. Cette réaction est catalysée par l'ARN polymérase ADN-dépendante (ou transcriptase). La transcription inverse est la synthèse d'un brin d'ADN à partir d'une matrice ARN grâce à l'ADN polymérase ARN-dépendante ou reverse transcriptase. Deux procédures ont été testées.

Dans la première, la transcription inverse est réalisée du côté 3' ou du côté 5' grâce au kit Gene Racer[®] d'Invitrogen et avec la reverse transcriptase du kit Omniscript[®] de QIAGEN. De courtes séquences nucléotidiques connues sont rajoutées en 3' ou 5'. Les amorces correspondantes sont fournies avec le kit et peuvent être utilisées dans le cadre des PCR.

Le Kit Marathon cDNA Amplification[®] de Clontech est également utilisé. La transcription inverse se fait à partir d'ARNs messagers uniquement, récupérés avec le kit mRNA batch[®] d'Oligotex. Comme avec le kit précédent, de courtes séquences nucléotidiques sont rajoutées en 3' et 5' et les amorces correspondantes sont fournies.

4.2. PCR (Polymerase Chain reaction)

Les PCR sont effectuées à partir d'ADN génomique ou d'ADNc obtenus par transcription inverse. La RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*) est une technique qui associe une RT suivie d'une PCR.

La réaction de polymérisation en chaîne permet d'amplifier sélectivement une séquence *in vitro*, à condition de disposer d'informations sur les séquences qui l'entourent. Des oligonucléotides amorces s'hybrident de part et d'autre de la séquence cible. L'ADN

portant la séquence à amplifier, une polymérase thermostable, ici la Taq Invitrogen[®], les 4 désoxynucléotides triphosphates (Eurogentec) et les amorces, sont soumis à différents cycles de température dans un thermocycleur classique (Biometra[®]) ou un thermocycleur à gradient de températures (Bio-Rad[®]).

Chaque cycle de PCR se compose de 3 étapes. L'étape de dénaturation permet de déshybrider les ADN double brin, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique et d'activer les polymérases. L'étape d'hybridation permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADNs matrices grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable. La phase d'élongation permet aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel à une température qui leur est optimale. La séquence cible aura donc été dupliquée. L'utilisation d'une polymérase thermostable permet de répéter immédiatement le cycle dénaturation - hybridation - élongation : au bout de n cycles, on aura amplifié 2^n fois la cible.

Pour le gène *Pax258*, les amorces Pax3/7F1 (5'-GGMGGCGTKAATCAAYTKGG-3') et Pax3/7R1 (5'-GTNGTTCGNACSCGKATHGTGGA3') ont été construites à partir de régions conservées dans la séquence de *Pax3/7a* d'*Helobdella sp.* (n° d'accension EMBL : DQ858213). Elles sont utilisées avec le cycle suivant : 5 min à 92°C puis 35x (1 min à 95°C, 1 min à 55°C, 1 min à 72°C) et 4 min à 72°C pour amplifier un fragment de 715 pb.

Les gènes *Shh* et *Pax6* ont également été caractérisés à l'aide d'amorces dégénérées. En ce qui concerne *Shh*, les amorces HH-F2 (5'-GCTGTMATGAAYGAATGGCCTGG-3') et HH-R3 (5'-GGTCAGCRTAKRTAGCTTCG-3') ont été construites à partir de régions conservées de la séquence de *hedgehog* d'*Octopus bimaculoides* (n° d'accension EMBL : DQ120051). Elles ont permis l'amplification d'un fragment de 513 pb chez *S. officinalis* (n° d'accension EMBL : AM939640). Quant à *Pax6*, l'amorce Pax6-F1 (5'-CTCCAACGGCTGCGTTAGCTAAG-3') a été réalisée conformément à la description de Tomarev et al. (1997), tandis que l'amorce Pax6-R4 (5'-GCTTCTATTTGTGCTGCAGT-3') a été construite selon Hartmann et al. (2003). A partir de ces amorces, un fragment de 354 pb a été obtenu chez *S. officinalis* (n° d'accension EMBL : AM422131).

Les positions des amorces sont indiquées sur les alignements de séquences nucléotidiques pour chaque gène en annexe 2. Plus de précisions concernant les conditions

d'obtention des gènes *Shh* et *Pax6* de *S. officinalis* sont apportées dans l'article, « *Shh* and *Pax6* have unconventional expression patterns in embryonic morphogenesis in *Sepia officinalis* (Cephalopoda) ».

Le gène *NK4* de *S. officinalis* (n° d'accèsion EMBL : AY298768), nous a été fourni par le DR. R.P. Harvey de l'unité de Biologie Développementale du centre de recherche cardiaque Victor Chang (Sydney, Australie).

4.3. Banque d'ESTs

Le séquençage d'ESTs (projet Génoscope) permet une meilleure accessibilité des gènes cibles. Les ESTs sont de courtes séquences nucléotidiques (200 à 700pb) qui correspondent à un fragment d'ADN complémentaire (ADNc), lui-même fabriqué à partir d'ARN messager (ARNm). La banque a été obtenue à partir d'un pool d'embryons de *S. officinalis*, des stades 15 à 30 (correspondant à la phase d'organogenèse). Cette étape a été effectuée par le Génoscope, le centre national de séquençage.

L'ARN total a d'abord été extrait à l'aide de Trizol (Invitrogen). L'ADN complémentaire a été synthétisé et amplifié via le kit Creator SMART cDNA library construction® (Clontech) puis normalisé via un kit Trimmer-direct® (Evrogen NK002). L'ADNc a ensuite été ligué dans un plasmide pDNR-LIB fourni avec le kit. 50000 ESTs ont ainsi pu être obtenues.

La clusterisation des fragments d'ADNc obtenus a été réalisée par Thomas Bekel du centre CeBiTec à l'Université de Bielefeld en Allemagne. Cette étape permet l'obtention de séquences plus longues à partir desquelles la construction d'amorces spécifiques est possible. Ces amorces sont ensuite utilisées pour réaliser des PCRs.

C'est le cas pour le gène *NK2*, qui a pu être caractérisé grâce à des amorces spécifiques, synthétisées à partir des domaines des gènes *NK* les mieux conservés entre les espèces, EH1 et l'homéodomaine. Il s'agit des amorces NK2F1 (AGTCCTATTGAGGAAACGTAC) et NK2R2 (GGGGGTCAAATTGATCATGCT) (positions en annexe 2). Le cycle d'amplification est le suivant : 5 min à 95°C puis 40x (1 min à 95°C, 1 min à 55°C, 1 min à 72°C) et 4 min à 72°C. Nous avons obtenu un fragment de 570 pb.

5. Clonage et séquençage

Les produits PCR sont nettoyés via le kit QIAquick[®] PCR purification de QIAGEN. Le produit PCR est ligué dans un plasmide artificiel pCR 4-TOPO (carte du plasmide en annexe 5) à température ambiante (Kit Invitrogen). Ce plasmide contient le gène codant pour la β -galactosidase précédé par son promoteur et deux gènes de résistance à l'ampicilline et à la streptomycine (annexe 3). Le transfert d'ADN dans des bactéries compétentes est réalisé lors d'un choc thermique à 42°C 30 secondes. Les bactéries sont étalées sur des boîtes de milieu LB (Luria-Bertani) supplémenté en ampicilline (5 mg/ml) et X-gal, substrat de la β -galactosidase.

Les bactéries recombinantes sont sélectionnées grâce à leur résistance à l'ampicilline. Seules les bactéries ayant intégré le plasmide portant le gène de résistance à cet antibiotique peuvent se développer en sa présence. De plus, les colonies portant des plasmides ayant intégré le produit PCR sont blanches. En effet, le gène de la β -galactosidase ne peut pas s'exprimer du fait de l'insertion de la séquence PCR après son promoteur. Un test PCR avec les amorces M13 forward (M13F) et M13 reverse (M13R) fournies dans le kit suivi d'une migration sur gel d'agarose est réalisé sur les clones sélectionnés, permettant de vérifier la présence d'une bande de taille correspondante au produit PCR. Une culture bactérienne est effectuée en milieu LB liquide supplémenté en ampicilline (5mg/ml) et les plasmides sont récupérés à l'aide du kit QIAprep Spin Miniprep[®] (QIAGEN). Ce test permet d'extraire l'ADN plasmidique par lyse alcaline. La construction est vérifiée par digestion par l'enzyme EcoR1 puis migration sur gel d'agarose. Les clones sont séquencés sous forme de Minipreps par l'entreprise Genome Express (Grenoble, France) ou GATC (Konstanz, Allemagne). La technique de séquençage utilisée est adaptée de celle de Sanger *et al.* (1977).

6. Synthèse d'une sonde

La sonde est un oligonucléotide de synthèse marqué à la digoxigénine couplée à une enzyme, la phosphatase alcaline. Ces éléments vont permettre la révélation de l'hybridation.

La sonde est réalisée à partir d'un plasmide linéarisé avec le kit Sp6 T7[®] et la polymérase T3 de Roche. Sp6, T7 et T3 correspondent à des sites présents sur le plasmide et encadrant la séquence d'intérêt (protocole en annexe 6). Le mix de synthèse se compose d'uracile couplé à des molécules de digoxigénine, des bases adénine, guanine et cytosine, d'un inhibiteur de ribonucléases (RNases) et d'une ARN polymérase Sp6, T7 ou T3. La sonde est réalisée dans les deux sens : une sonde anti-sens et une sonde sens visant à vérifier l'absence de bruit de fond dû au plasmide lors de l'hybridation *in situ*.

7. Hybridation *in situ*

Les embryons sont fixés dans du PFA à 3,7% une nuit avec leur chorion et une seconde nuit sans leur chorion. Après trois lavages dans du PBS1X (tampon phosphate) pour éliminer le PFA, une déshydratation progressive est opérée dans des bains contenant une part de méthanol de plus en plus importante, de 25 à 100%.

Le principe de l'hybridation *in situ* (HIS) consiste à hybrider sur un organisme entier une séquence complémentaire d'acide nucléique marqué (sonde) avec sa séquence spécifique pour réaliser une molécule double brin stable. Les compositions des tampons utilisés dans l'HIS sont en annexe 7 et le protocole en son intégralité se trouve en annexe 8. L'HIS a été réalisée avec une sonde du gène *Nk2* sur des stades 15, 16, 17, 18, 19 et 20 d'embryons de *Sepia officinalis*. Il s'agit de stades précoces durant lesquels se déroule l'organogenèse. Les différentes structures caractéristiques de l'espèce modèle sont donc déjà bien visibles.

Une réhydratation et un lavage des organismes sont effectués par des immersions successives (5 min, température ambiante) dans une solution de PTW/méthanol (PBS 1X, Tween20 0,1%, méthanol de 60% à 0%). Les tissus sont perméabilisés grâce à l'ajout de la protéinase K (10 µg/ml). Le temps d'incubation en présence de l'enzyme varie de 20 à 40

minutes en fonction des stades des embryons. Les embryons sont ensuite fixés une heure dans un bain de PFA 3,7%.

Un bain de pré-hybridation dans une solution SH (formamide 50%, SSC5X, Tween20 0,1%, SDS 1%) additionnée d'héparine (25 µg/ml) et de tRNA (100 µg/ml) permet l'imprégnation progressive des tissus. La solution contient du formamide qui dénature la sonde afin qu'elle puisse s'hybrider facilement à sa cible en rompant les liaisons hydrogènes. Les embryons sont baignés dans la solution d'hybridation (SH, héparine 33 µg/ml, tRNA 400 µg/ml) à laquelle la sonde (300 ng/ml) a été additionnée pendant toute la nuit à 65°C. La sonde sens est ajoutée aux embryons qui serviront de témoins négatifs à la fin de la manipulation. L'excès de sonde est éliminé par 5 rinçages dans une solution SH (30 min, 65°C). Le SSC 20X, un tampon citrate, va augmenter la force ionique et faciliter ainsi les hybridations. Comme le formamide, il va augmenter la stringence du milieu et favorise l'hybridation. Un bain d'1h dans une solution contenant des ribonucléases (RNases A, 100 µg/ml) permet la suppression des sondes qui ne se sont pas hybridées.

Les embryons sont ensuite pré-imprégnés dans le tampon de la solution de blocage (BS : acide maléique 100mM, NaCl 150mM, pH 7,5, Tween20 0,1%). Des passages dans la solution de blocage (BS, BB 4% Roche, FBS 15%, 1h, RT) supplémentée en FBS 15% et Blocking Reagent® 4% (Roche) permettent de saturer les sites de fixation libre avant que le tissu ne soit incubé en présence d'anticorps anti-digoxygénine (Roche, $3,3 \cdot 10^{-4}$ U/µl) couplés à la phosphatase alcaline sur la nuit à 4°C en solution de blocage (BS, BB 2,4%, FBS 20%). Plusieurs lavages dans une solution de BS sont nécessaires pour éliminer l'excès d'anticorps qui ne s'est pas fixé. La révélation des hybridations se fait à l'ajout du substrat de la phosphatase alcaline : le NBT-BCIP (BCIP 0,19 mg/ml, NBT 0,37 mg/ml), ceci après imprégnation par le tissu du tampon AP (phosphatase alcaline). Les phosphatases endogènes sont inhibées en présence de levamisol 500 µM. Le temps de révélation peut varier de 3 à 24h jusqu'à ce que le signal cesse de s'intensifier. La coloration est enfin relancée sur 48h après prise de photo des embryons qui doivent être sectionnés. La réaction est stoppée avec un lavage au PTW et une ultime fixation dans du PFA 3,7 % (de 24 à 60 h).

8. Coupes

Après fixation, Les embryons utilisés pour les HIS *Shh*, *NK2*, *Pax6* et *Pax258* ont été inclus en solution gélatine/saccharose (tampon phosphate 0,12M, saccharose 12%, gélatine 7,5%), puis refroidis rapidement dans de l'isopentane liquide à -80°C. Les blocs sont ensuite coupés en sections de 20 µm sur un cryostat Microm Cryo-Star[®] HM 560 MV. Les coupes sont enfin montées dans du moviol. Les observations ont été réalisées sur un microscope Leica M16 2F.

Les embryons ayant servi pour les HIS *NK4* ont été déshydratés dans un bain d'éthanol absolu pendant une nuit, puis inclus dans des blocs de paraffine. Ces blocs ont ensuite été taillés au microtome en coupes histologiques de 7 µm d'épaisseur.

Si les HIS permettent de déterminer les patterns d'expression des gènes et d'avancer des hypothèses quant à leurs rôles, des approches fonctionnelles restent indispensables pour vérifier ces inférences. Des balnéations d'embryons de *Sepia officinalis* ont donc été réalisées. Les embryons ont poursuivi leur développement en présence d'inhibiteurs. Un protocole d'injections a été également mis en place ; le but est d'injecter des Morpholinos et des ARNs entiers pour surexprimer des gènes.

9. Approches fonctionnelles

Les approches fonctionnelles ont consisté à effectuer des « soakings » ou balnéations des embryons de seiche à divers stades. Il s'agit de laisser se développer les embryons en présence de différents inhibiteurs. Une mise en place d'un protocole d'injection a également été engagée en vue d'injecter des Morpholinos. Ce type de manipulation n'avait encore jamais été tenté sur des embryons de Céphalopodes.

Les œufs utilisés pour les manipulations de balnéation nous ont été gracieusement procurés de la station de Luc-sur-Mer par Joël Henry (Université de Caen), de Concarneau par Morgane Nedelec (Institut Agrocampus Ouest), de la Station Biologique de Roscoff par Sébastien Henry, de l'Aquarium La Rochelle par Pierre Moriniere, et de Sète par Nicolas Bierne (Institut des Sciences de l'Évolution, Montpellier).

9.1 Traitements à la cyclopatamine

La cyclopatamine est un tératogène isolé de *Veratrum californicum*, C'est un inhibiteur reconnu de la voie de *hedgehog* chez des Vertébrés et non-Vertébrés (Cooper et al., 1998 ; Incardona et al., 1998, 2000 ; Kang et al., 2003). Cette molécule agit en se liant à Smo et en entrant ainsi en compétition avec SHH. En effet, en présence de cyclopatamine, Smo reste inactivé par Ptc même en présence de SHH (fig. 30).

La cyclopatamine (Fermentek Ltd.) est diluée à une concentration finale de 10 µM en 0.1 % éthanol dans de l'eau de mer stérile. Les membranes d'embryons stade 16 sont retirées, seul le chorion est laissé. Les embryons se développent en présence de cyclopatamine pendant 8 à 10 jours (jusqu'aux stades 23-24). Les embryons contrôles se développent dans de l'eau de mer stérile additionnée de 0.1 % d'éthanol.

9.2 Traitement au SB 431542

Le SB 431542 est un inhibiteur de la voie de Nodal. La superfamille des TGFβ inclut un grand nombre de ligands. Le SB 431542 interfère de façon spécifique avec les récepteurs de type I. De ce fait, seules les activités de Nodal et de l'activine sont bloquées par l'inhibiteur. Aucune trace de l'activine n'a été trouvée dans la banque d'ESTs réalisée à partir d'embryons de *S. officinalis*, ce qui suggère que l'ARNm correspondant est absent et donc que la protéine n'est pas produite pendant l'embryogenèse. Par ailleurs, aucune séquence proche de l'activine n'a été décrite jusqu'ici chez les Céphalopodes. Il est fort probable que le SB431542 appliqué durant le développement d'embryons de seiche n'ait pu inhiber que Nodal.

Le SB 431542 (Sigma) est dilué à une concentration finale de 10 µM en 0,1 % DMSO en eau de mer stérile. Les membranes d'embryons stade 16 sont retirées, seule la membrane chorionique est laissée. Les embryons se développent en présence de SB 431542 pendant 8 à 10 jours (jusqu'aux stades 23-24). Les embryons contrôles se développent dans de l'eau de mer stérile 0.1 % DMSO.



Etuve contenant les portoirs qui portent les tubes contenant les embryons en développement

Pour les deux traitements, les embryons poursuivent leur développement dans des tubes individuels, contenant environ 3ml de solution. La solution est remplacée tous les jours, à une température constante de 18°C. Les tubes sont entourés de papier aluminium afin d'imiter l'obscurité provoquée par les membranes gélatineuses noires. Les embryons sont ensuite fixés en PFA

3,7% pendant 4h à 4°C. Après 5 rinçages en PBS 1X, ils sont conservés en PBS1X/glycérol 20% jusqu'à utilisation en HIS.

9.3. Mise en place d'un protocole d'injection

Le but ultime est de parvenir à mettre en place un protocole d'injection sur embryons de seiche, ceci dans la perspective de pouvoir utiliser des morpholinos afin d'inactiver des gènes ou encore d'injecter des ARN entier de façon à surexprimer un gène. Il a été montré chez la *Drosophile* et *Caenorhabditis elegans*, que le simple ajout de morpholinos dans la nourriture permettait un passage de ceux-ci dans l'organisme et l'inactivation des ARNs cibles (*Drosophila* : Huvenne et Smagghe, 2009 ; *C. elegans* : Kamath et al., 2001 ; Ohkumo et al., 2008). Les injections ont donc été réalisées dans le vitellus des embryons de seiche, le plus précocement possible.



Dispositif d'injections dans les embryons de seiche

Une première série de tests de survie à la pique a été effectuée avec un injecteur Drummond « Nanoject II ». Les embryons, affranchis des membranes noires, mais encore entourés de leur chorion, sont piqués sans injections à différents stades, du 8 au 19, puis distribués dans plusieurs récipients contenant de l'eau de mer filtrée (filtre 0,22 μm) ainsi qu'un bulleur par récipient. Les embryons sont maintenus à température ambiante, oscillant entre 18 et 22°C. Les récipients dans lesquels ils poursuivent leur développement sont préalablement stérilisés et entourés d'aluminium pour recréer l'obscurité générée par les membranes noires des œufs.

On définit comme « taux de survie partielle » le pourcentage d'embryons ayant atteint au minimum le stade suivant le début du traitement. Le taux de survie partielle global est faible, 11,18%. Un maximum a été atteint pour les œufs piqués au stade 15, soit au début de l'organogénèse, avec 38,8% d'embryons ayant poursuivi leur développement jusqu'au stade 22. Il est possible que la proximité entre les œufs ait conduit à une surmortalité. Un œuf dégradé pourrait avoir une influence sur les autres.

C'est pourquoi, une deuxième série de tests de survie des embryons à la pique a été effectuée en mettant les œufs, toujours entourés du chorion, en tubes individuels avec 3 ml d'eau de mer stérilisée (filtrée sur filtre 0,22 μm puis autoclavée). Les tubes sont également entourés d'aluminium et la température est maintenue à 17°C. Les stades testés sont les 15, 17, 20 et 25. A chacun de ces stades, chaque œuf subit une injection de 2,3 nl d'eau de mer stérile. Aucun embryon n'a continué son développement jusqu'au stade 30. En ce qui concerne le taux de survie partielle, les résultats suivants ont été obtenus :

- survie partielle traités stade 17 : 40% (ayant atteint le stade 20) ;
- survie partielle traités stade 20 : 37% (ayant atteint le stade 21+) ;
- survie partielle traités stade 21+ : 51% (ayant atteint le stade 22).

D'une façon générale, les embryons traités plus tardivement survivent mieux au traitement. La deuxième série de tests montre un taux de survie global bien supérieur à la première série. Le fait de laisser les embryons en tubes individuels se révèle déterminant. Cet élément sera à prendre en compte pour les futures manipulations utilisant des injections.

I. Contrôle moléculaire de la mise en place du complexe neuro-musculaire chez les Céphalopodes. Implications évolutives sur la fonction de locomotion.

Deux types de systèmes locomoteurs sont utilisés chez les Céphalopodes actuels. Les Coléoides, dont la coquille est interne, se déplacent par propulsion à réaction, en rejetant l'eau contenue dans la cavité palléale du manteau par l'entonnoir. Les Nautilidés utilisent aussi la propulsion mais différents mécanismes sont mis en œuvre. En effet, le manteau, collé contre la coquille ne joue aucun rôle dans la locomotion. La force motrice est fournie par l'entonnoir et les ailes, organes musculaires qui y sont attachés. La coquille externe du nautilite est composée de plusieurs loges qui communiquent entre elles par un siphon, la dernière loge étant occupée par le corps de l'animal. La proportion gaz/liquide dans les autres loges permet de contrôler la flottabilité de l'animal et, ainsi, de maintenir un équilibre hydrostatique. Alors qu'au début de l'Ordovicien (-500 millions d'années), les Nautilidés étaient répandus dans toutes les mers du globe, ils se trouvent aujourd'hui dans une seule région de l'océan Pacifique et vivent autour de 400 mètres de profondeur. Ce biotope bien particulier lui permet de survivre grâce à une compétition limitée dans cette niche écologique. Tous les autres Céphalopodes actuels possèdent une coquille interne, régressée comme chez *S. officinalis* et les calmars ou très régressée, voire absente, chez les Octopodes.

La régression de la coquille chez les Céphalopodes a eu des conséquences morphologiques et anatomiques majeures, notamment, en ce qui concerne le système locomoteur de l'animal. Le manteau, dédié presque exclusivement à la sécrétion de la coquille chez les autres Mollusques, a gagné en muscles chez les Céphalopodes. Ces muscles sont assez puissants pour assurer une locomotion par propulsion en milieu aquatique. La présence de l'hydrostat (manteau et entonnoir) confère un avantage considérable aux Céphalopodes et plus particulièrement aux Coléoides : une locomotion rapide par propulsion à réaction permettant un mode de prédation efficace et la possibilité de fuir très vite. Le manteau et l'entonnoir sont associés aux bras permettant chez certaines espèces la progression sur le substrat (brachiation). L'évolution de ces structures a été sans aucun doute un évènement clé pour l'adaptation des Céphalopodes dans les océans pendant le Cambrien tardif, il y a 500 millions d'années (Young et al., 1998).

1. Les structures musculaires chez la seiche, innovations morphologiques et particularités histologiques

Chez les Céphalopodes, le pied caractéristique des Mollusques est modifié en 8 à 10 appendices préhensiles (bras et tentacules) et en un entonnoir (fig. 14). L'entonnoir et le manteau sont impliqués dans la locomotion par propulsion, les bras permettant chez certaines espèces la brachiation. La musculature des Céphalopodes présente en très grande majorité une striation oblique, due à la disposition « inclinée » des sarcomères (Gonzalez-Santander and Garcia-Blanco, 1972), ceci à la différence des Vertébrés dont les muscles squelettiques sont à striation transversale (Hanson, 1973). Pendant le développement, la morphogenèse des bras commence par la formation d'une couronne brachiale au stade 15 qui a la forme d'un bourrelet circulaire en limite du disque embryonnaire. C'est à partir de cette couronne que prennent forme les bourgeons de chaque bras. Pour une raison encore inconnue, ces bourgeons passent par une phase où ils sont bilobés, ceci aux alentours des stades 18 et 19, cette phase étant variable selon les embryons. La musculature des Céphalopodes est donc spécifique du point de vue non seulement morphologique, mais aussi, histologique.

De même, alors que l'une des caractéristiques des Mollusques est la présence d'une coquille externe sécrétée par le manteau, les Céphalopodes Coléoides présentent une

coquille interne, formée dans le sac coquillier. Dans les stades précoces, le manteau embryonnaire s'invagine et délimite un sac coquillier circulaire interne (Boletzky, 2006). Cette cavité croît pendant les stades 17 à 19, tandis que l'ouverture à la surface du manteau décroît et se ferme au stade 20. L'épiderme internalisé du sac coquillier sécrète la matrice organique de la coquille puis un periostracum au stade 21. La minéralisation aragonitique commence au stade 24 (fig. 14).

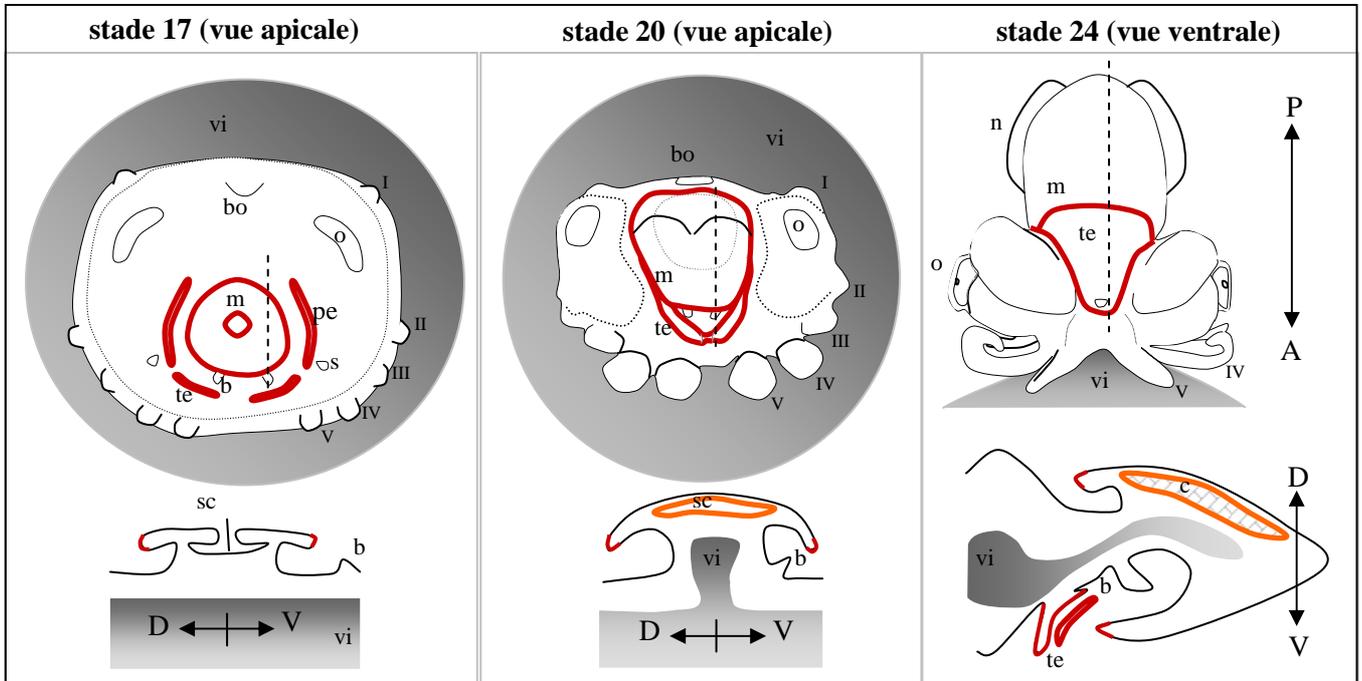


Figure 14 : Représentations schématiques d'embryons de *S. officinalis* pendant l'organogénèse, des stades 16 à 24. Les figures du haut représentent des vues externes des embryons ; les figures du bas montrent des sections transversales dans la région du manteau (tirets dans les figures du haut). Les bords du manteau et de l'entonnoir sont surlignés en rouge tandis que la coquille est surlignée en orange.

Légende : I, II, III, IV et V, bras ; b, branchie ; bo, bouche ; m, manteau ; n, nageoire ; o, œil ; pe, poche de l'entonnoir ; s, statocyste ; sc, sac coquillier ; te, tube de l'entonnoir ; vi, vitellus ; A, antérieur ; D, dorsal ; Dr, droite ; G, gauche ; P, postérieur ; V, ventral.

2. Contexte de l'étude de la myogenèse chez les Céphalopodes

Chez les Vertébrés, la myogenèse des muscles squelettiques, donc à fonction essentiellement locomotrice, est contrôlée surtout par des facteurs de régulation myogéniques (MRFs) à structure « hélice-boucle-hélice », et, en particulier, la famille de MyoD incluant les gènes *MyoD*, *Myogenine*, *Myf5* et *MRF4* (Emerson, 1993 ; Weintraub, 1993). Ces facteurs sont essentiels à la différenciation musculaire et leur inactivation entraîne des déficiences majeures au niveau de la myogenèse (Nabeshima et al., 1993). Chez les non-Vertébrés, il ne semble exister qu'un seul MRF dans toutes les espèces qui ont été étudiées : *nautilus* chez *D. melanogaster* (Paterson et al., 1991 ; Wei et al., 2007), *hh-1* chez *C. elegans* (Krause et al., 1990), *sum-1* chez l'oursin (Venuti et al., 1991).

En 2004, Grimaldi et al. affirment avoir identifié deux MRFs chez *S. officinalis*, Myf5-like et MyoD-like. Il s'avère que la détection de ces gènes s'est faite par immunomarquage à l'aide d'anticorps ciblant les gènes *MyoD* et *Myf5* de souris. Les chercheurs ont alors observé des marquages au niveau des tentacules d'un embryon de *S. officinalis* stade 26, soit tardivement dans l'organogenèse, dans les muscles dits « smooth-like » pour *Myf5* et dans des fibres striées transversales pour *MyoD*. Or, d'après Kier (1996), la mise en place des muscles striés transversaux dans le tentacule chez *Loligo pealii* se fait tardivement, 4 à 5 semaines après éclosion. Il est donc assez surprenant de constater l'existence de tels muscles aussi précocement dans le développement d'un autre Céphalopode. Par ailleurs, nous avons tenté de réaliser des hybridations *in situ in toto* sur des stades tardifs de *S. officinalis* en utilisant des sondes ARN correspondant aux gènes *MyoD* et *Myf5* de souris. Or, aucun marquage n'a pu être observé. Enfin, aucun MRFs n'a été retrouvé dans la banque d'ESTs pour *S. officinalis*. Cette absence notable de gènes appartenant à cette famille, tels que *MyoD* ou *Myf5*, présents dans un grand nombre de phyla est étonnante. Si les MRFs ne sont pas impliqués dans la myogenèse chez *S. officinalis*, d'autres gènes doivent y participer. Nous nous sommes donc focalisés sur des gènes appartenant aux familles *NK* et *Pax*, des gènes « multifonctions » et de première importance dans la régulation des processus développementaux chez de nombreuses espèces (Wotton et al., 2009 ; Noll, 1993).

3. *NK4*, un recrutement dans les muscles locomoteurs

NK4 est l'un des nombreux facteurs de transcription impliqués dans la myogenèse chez les Vertébrés (myogenèse squelettique : Riazi et al., 2005 ; cardiomyogenèse : Olson, 2006). Nous avons déterminé son pattern d'expression par HIS lors de l'embryogenèse de *S. officinalis*, pendant toute la phase d'organogenèse, du stade 15 à éclosion (fig. 15 à 18). Cette étude a fait l'objet d'une publication en 2009, «Somatic muscles development in *Sepia officinalis* (Cephalopoda) : a new role for *NK4*». *NK4* s'exprime de façon très précoce, au stade 15, avant que les structures ne soient visibles, dans les territoires présomptifs du manteau (fig. 15a). Des coupes aux stades précoces montrent que l'expression de *NK4* est exclusivement mésodermique (fig. 16d, 16e, 16g). Cette expression dans le manteau se maintient jusqu'au stade 22 à partir duquel le marquage diminue en intensité (fig. 17d). A partir du stade 24, la couche mésodermique dorsale du manteau est réduite à une fine membrane recouvrant la coquille, tandis que la couche ventrale est constituée d'une épaisse couche musculaire. *Nk4* est cependant exprimé de la même façon sur les faces dorsale et ventrale du manteau (fig. 18b, 18e, 18f). A partir du stade 28, *NK4* n'est plus exprimé dans cette zone. *NK4* ne semble donc pas être impliqué dans la réorganisation musculaire tardive mais dans la différenciation musculaire précoce dans la région du manteau.

NK4 est également exprimé au niveau des bourgeons des bras de façon séquentielle. En effet, dans les stades précoces, 14/15, toutes les zones prospectives des bras sont marquées, à l'exception des bras III qui se développent au stade suivant et ne sont visibles morphologiquement qu'au stade 17 (fig. 15a). Le marquage du bras II s'accompagne d'une extension antérieure de marquage qui suggère une migration cellulaire du fait de la disparition de cette trainée au stade suivant (fig. 15d). A un stade 15 avancé, c'est le bras I qui montre une extension semblable (fig. 15e). A partir du stade 17, tous les bourgeons des bras sont visibles et marqués (fig. 16a), y compris les bras III qui montrent aussi une extension du marquage (fig. 16b). Au stade 18, une expression éparse de *NK4* a également été détectée au niveau du tube de l'entonnoir (fig. 16f). L'expression de *NK4* dans les bras se maintient jusqu'au stade 20, stade à partir duquel la coloration s'atténue (fig. 17b). Le marquage semble suivre la mise en place des bras, comme suggéré par le marquage des bras III qui apparaît en même temps que sa mise en place anatomique (fig. 16b). Baratte et al. (2007) ont également montré une expression séquentielle de la protéine Engrailed dans

cette même phase de l'embryogenèse de *S. officinalis*, au niveau des bras. L'expression de *NK4* au niveau des bras est restreinte aux côtés externes (future partie dorsale) des bourgeons (fig. 16b). Lorsque les bourgeons des bras sont bilobés (stades 18/20), seuls les lobes externes restent marqués (fig. 16f). Ce phénomène est visible également sur les coupes (fig. 16d et 17 e).

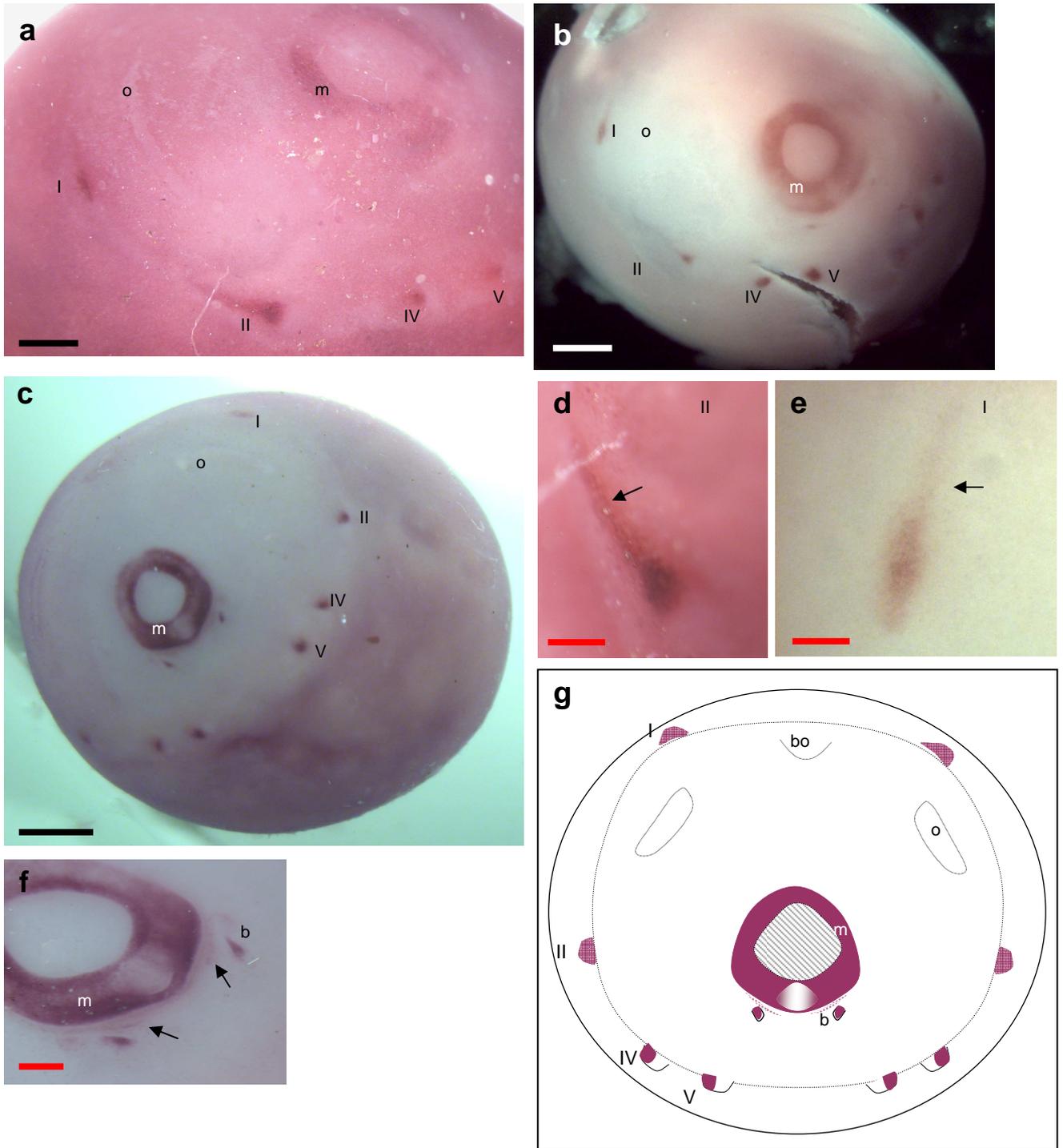


Figure 15 : Expressions de *NK4* pendant l'organogénèse précoce de *S. officinalis*. Hybridation *in situ in toto*. Echelles noires 500μm, échelles rouges, 250μm. Vues apicales. **a**, stade 15 précoce ; **b**, stade 15 tardif ; **c**, stade 16 ; **d**, agrandissement de la zone du bras II de la photo a ; **e**, agrandissement de la zone du bras I de la photo b ; **f**, agrandissement de la zone du manteau de la photo c.

Légende : I, II, III, IV et V, bras ; b, branchie; bo, bouche ; m, manteau ; o, œil.

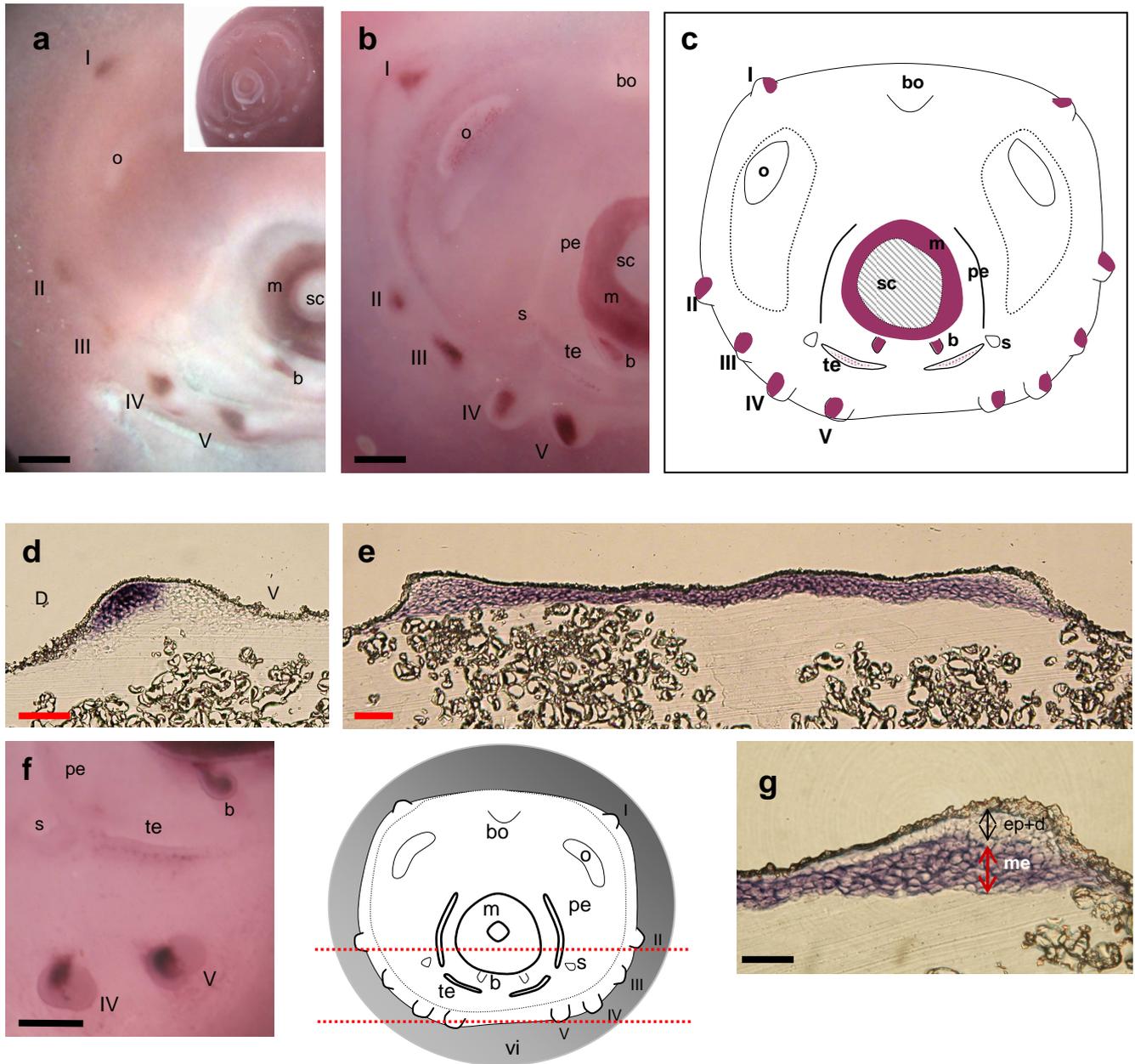


Figure 16 : Expressions de *NK4* pendant l'organogénèse de *S. officinalis*. Hybridations *in situ in toto*. Echelles noires 250μm, échelles rouges, 25μm. Encart : témoin. **a, b, c** : vues apicales ; **a**, stade 17 ; **b**, stade 18 ; **d, e, g** : sections au cryostat d'une épaisseur de 20 μm (niveaux de sections indiqués en pointillés rouges) sur un stade 18 ; **d**, coupe au niveau des bras V ; **e**, coupe au niveau du manteau. **f**, agrandissement de la zone du tube de l'entonnoir d'un stade 18 ; **g**, coupe au niveau du bord du manteau.

Légende : I, II, III, IV et V, bras ; b, branchie; bo, bouche ; d, derme ; ep, épiderme ; m, manteau ; me, mésoderme ; o, œil ; pe, poche de l'entonnoir ; s, statocyste ; sc, sac coquillier ; te, tube de l'entonnoir.

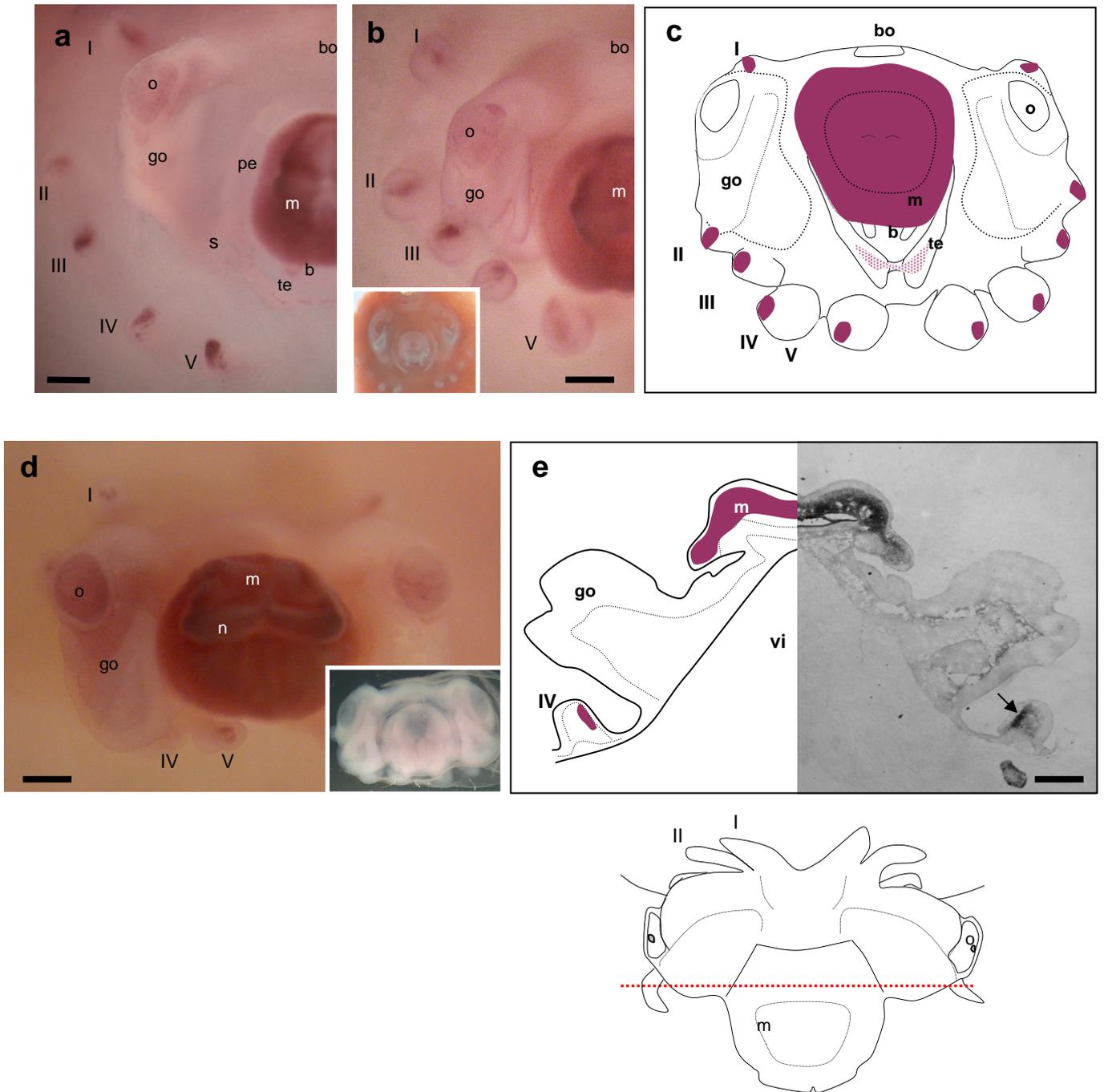


Figure 17 : Expressions de *NK4* pendant l'organogenèse de *S. officinalis*. Hybridations *in situ in toto*. Echelles noires 250µm. Encarts : témoins. **a, b, c, d**, vues apicales ; **a**, stade 20 ; **b**, stade 21 ; **d**, stade 22 ; **e**, section au cryostat d'une épaisseur de 20 µm (niveau de section indiqué en pointillés rouges).

Légende : I, II, III, IV et V, bras ; b, branchie; bo, bouche ; go, ganglion optique ; m, manteau ; o, œil ; pe, poche de l'entonnoir ; s, statocyste ; sc, sac coquillier ; te, tube de l'entonnoir ; vi, vitellus.

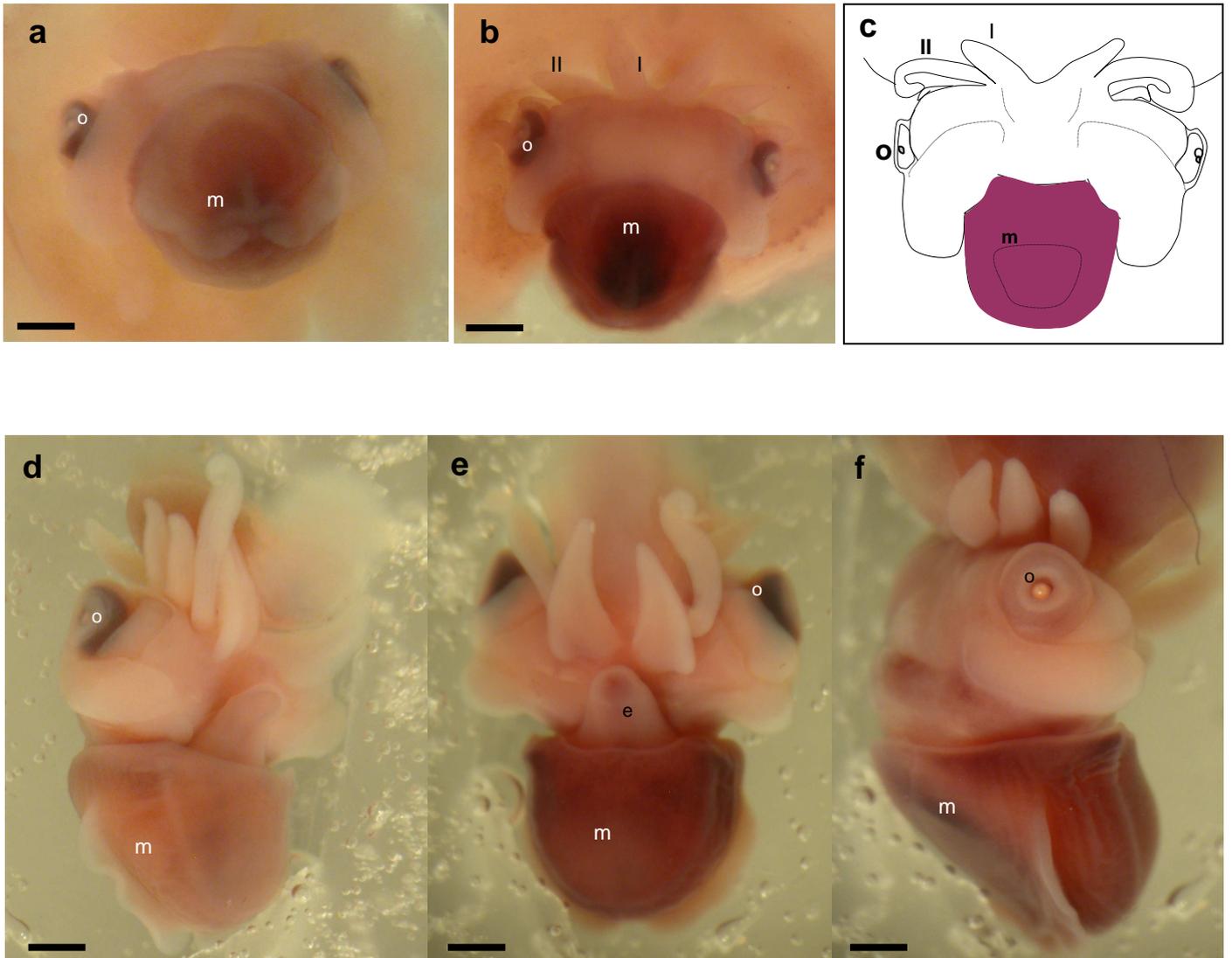


Figure 18 : Expressions de *NK4* pendant l'organogenèse tardive de *S. officinalis*. Hybridations *in situ in toto*. Echelle 1mm. **a**, témoin stade 24 ; **b, c** : stade 24 ; **d**, témoin stade 26 ; **e, f**, stade 26.

Légende : I, II, III, IV et V, bras ; e, entonnoir ; m, manteau ; o, œil.

NK4 est principalement exprimé dans des structures appartenant à l'hydrostat, manteau, bras et entonnoir, impliquées dans la locomotion. Pourtant, chez d'autres espèces, *NK4* a été principalement lié aux muscles cardiaux qui sont de nature différente, puisque ce sont des muscles lisses. En effet, chez les Vertébrés, l'homologue de *NK4*, *NKx2.5*, est exprimé au niveau du muscle cardiaque (Olson, 2006). Ce gène participerait à la morphogenèse du cœur (Lyons et al., 1995). Chez la drosophile, *Tinman*, l'homologue de *NK4*, serait impliqué plus précocement dans le développement, dans la détermination des cellules cardiaques (Bodmer, 1993). Enfin, chez *Caenorhabditis elegans*, *ceh-22*, homologue de *NK4*, a montré une expression restreinte aux muscles pharyngiens (Okkema et al., 1997). Ces muscles sont assimilés au cœur des Vertébrés par leurs contractions rythmiques caractéristiques. Que ce soit de façon précoce, dans la détermination cellulaire, chez la drosophile, ou bien plus tardivement, dans la cardiogenèse chez la souris, *NK4* était jusque-là indéniablement lié aux muscles cardiaux ou, plus généralement, aux muscles à contractions rythmiques, concernant *C. elegans*. Pendant l'embryogenèse chez *S. officinalis*, des expressions de *NK4* ont été détectées au niveau de la base des branchies, zone correspondant aux futurs cœurs brachiaux à un stade 16. Aucune coloration n'a cependant été observée au niveau du cœur systémique, ce qui ne laisse pas envisager *NK4* comme un gène « maître » dans la formation des tissus cardiaux chez *S. officinalis*. Chez *S. officinalis*, *NK4* s'exprime principalement dans les muscles locomoteurs, manteau, entonnoir et bras alors que chez les Vertébrés, ce sont les MRFs qui participent à la myogenèse des muscles locomoteurs (Nabeshima et al., 1993).

Les muscles composant ces structures sont striés de façon oblique chez les Céphalopodes. Ces muscles peuvent être assimilés aux muscles squelettiques des Vertébrés par leur fonction locomotrice. Or ils n'expriment pas *NK4*. Les muscles squelettiques des Vertébrés sont des muscles à striation transversale, tandis que les structures locomotrices des Céphalopodes sont composées de muscles à striation oblique. L'expression de *NK4* dans ce type musculaire pourrait suggérer un rôle de ce gène spécifique à ce type musculaire.

NK4 seraient donc impliqués dans la formation du manteau, bras et entonnoir chez *S. officinalis*. Ces structures musculaires appartiennent à l'hydrostat et sont des caractères dérivés parmi les Mollusques. *NK4* a pu être secondairement recruté dans la lignée des Céphalopodes pour le développement de ces structures concomitamment à l'internalisation

de la coquille (Navet et al., 2010). La coquille externe protectrice, progressivement devenue une « contrainte », a été contre-sélectionnée, sa réduction et le développement ultérieur du manteau se présentant alors comme une stratégie évolutive « gagnant-gagnant ». En effet, en l'absence d'une coquille protectrice, la présence de ces caractères permet une locomotion efficace pour échapper aux prédateurs, tout en contribuant à une meilleure activité prédatrice.

4. *Pax2/5/8*, des rôles conservés et étendus à la mise en place de tissus mésodermiques

Des résultats récents ont été obtenus à propos du gène *Pax2/5/8*. Ces résultats, qui feront l'objet d'une publication, apportent des éléments clés pour la compréhension des mécanismes ayant conduit à l'émergence des structures musculaires dérivées des Céphalopodes. Des HIS réalisées pendant l'embryogenèse de *S. officinalis* ont montré que le gène *Pax2/5/8*, comme le gène *NK4*, s'exprime de façon très précoce durant le développement de *S. officinalis* (fig. 19). Une expression de *Pax2/5/8* au niveau des branchies peut être notée dès les stades précoces (fig. 19a, 19b, 19c). Elle se maintient dans l'intégralité de ces structures jusqu'au stade 22 (fig. 20b). Des expressions dans les branchies ont déjà été relevées chez l'Urochordé *Oikopleura dioica* (Bassham et al., 2008) et l'amphioxius (Kozmik et al., 1999). De plus, PAX2 jouerait un rôle dans la perforation des branchies chez *Xenopus* (Heller and Brändli, 1999). Cela pourrait refléter une fonction du gène dans la perforation des branchies de *S. officinalis*. Une autre expression très précoce, aux stades 16 et 17, est celle détectée dans les vésicules des statocystes (fig. 19a et 19b). Jusqu'ici, seul un Mollusque, le Gastropode *Haliotis asinina*, a fait l'objet de l'élaboration d'un pattern d'expression de *Pax2/5/8*. O'Brien et Degnan (2003) ont mis en évidence un marquage dans les statocystes du Gastropode, suggérant ainsi un rôle conservé de PAX2/5/8 au niveau des organes sensoriels géotactiques. Chez la seiche, deux zones symétriques au niveau de la masse supra-œsophagienne expriment *Pax2/5/8* au stade 23 (fig. 20c et 20e). Ces zones correspondent aux tractus optiques gauche et droit de l'embryon (fig. 20d, flèches). Ce lien entre les gènes de la famille *Pax2/5/8* et la formation des yeux et des structures attachées a déjà été montré. Chez l'amphioxius, un Céphalocordé, *Pax2/5/8* s'exprime dans les cellules de soutien des yeux durant leur

développement (Kozmik et al., 1999). Chez les Vertébrés, *Pax2* est exprimé de façon concomitante à *Pax6* dans les vésicules optiques (Baumer et al., 2003). Chez le poisson-zèbre, une expression de *Pax8* a également été observée dans les mêmes domaines optiques que *Pax2* (Pfeffer et al., 1998). Enfin, au sein des Mollusques, principalement les Gastropodes, une expression de *Pax2/5/8* est détectée au niveau de la zone optique des larves véligères et persiste après métamorphose dans les yeux des adultes (O'Brien and Degnan, 2000, 2003). Ainsi un lien entre PAX2/5/8 et la formation d'organes sensoriels existe bel et bien chez de nombreuses espèces. Cependant, si ce lien semble être conservé chez *S. officinalis*, de façon surprenante, l'expression de ce gène se situe majoritairement dans des structures constituant des synapomorphies des Céphalopodes, d'origine mésodermique.

En effet, au stade 17, tous les bras sont marqués, à l'exception du bras III encore à peine visible (fig. 19b). L'intensité de marquage est la plus forte pour les bras V. *Pax2/5/8* s'exprime au niveau des bourgeons des bras, sur leur côté interne (fig. 19a), à la différence de *NK4* qui, au même stade, montre une expression sur les côtés externes (fig. 16b). Une expression transitoire au niveau des territoires présomptifs des ganglions pédieux peut aussi être observée au stade 17 (fig. 19b). Le manteau est également marqué dès le stade 16, et de façon plus prononcée sur les bords (fig. 19a). Ce marquage se maintient au stade suivant en s'accroissant sur l'intégralité du manteau (fig. 19b). A partir du stade 17, s'ajoute un marquage intense au niveau des tubes de l'entonnoir (fig. 19b), qui se maintient aux stades suivants (fig. 19c et 20b) comme visible sur les coupes (fig. 20f et 20g). Au stade 20, les marquages au niveau des bras se maintiennent, tandis que l'expression de *Pax2/5/8* dans le manteau, dont le sac coquillier est maintenant fermé, est toujours très intense (fig. 20a). Le marquage dans le manteau s'accroît au stade 21 à l'opposé de celui des bras qui s'atténue (fig. 20b). L'intensité d'expression de *shh* au niveau du manteau, bras et entonnoir atteint ensuite un maximum au stade 25 (fig. 21b, 21c, 21d), tandis qu'un marquage particulièrement prononcé peut être noté tout autour du sac coquillier (fig. 22a à 22d). Les coupes à ce stade indiquent clairement que ce sont les couches musculaires qui expriment le gène. L'expression de *Pax2/5/8* au niveau des bras ne semble pas restreinte à une couche musculaire spécifique. Cependant, on observe que le marquage est particulièrement intense du côté des ventouses (fig. 22e et 22f). Les ventouses, pourtant

très musculeuses, restent dénuées de marquage. Ces marquages musculaires décroissent en intensité au stade 26 jusqu'à disparaître complètement au stade suivant.

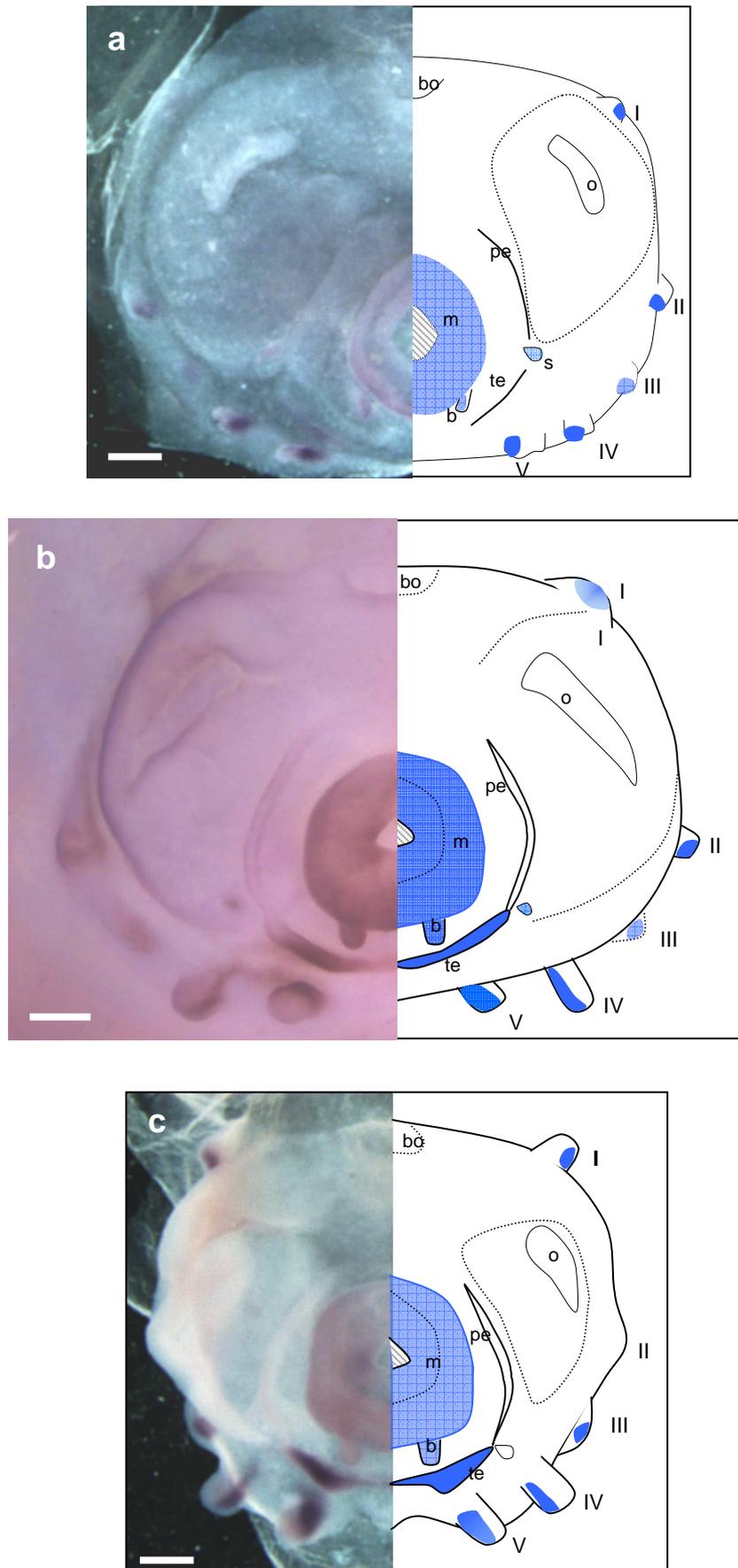


Figure 19 : Expressions de *Pax2/5/8* pendant l'organogenèse précoce de *S. officinalis*. Hybridations *in situ in toto*. Echelle 250µm. Vues apicales. **a**, stade 16 ; **b**, stade 17 ; **c**, stade 19.

Légende : I, II, III, IV et V, bras ; b, branchie; bo, bouche ; m, manteau ; o, œil ; pe, poche de l'entonnoir ; s, statocyste ; sc, sac coquillier ; te, tube de l'entonnoir.

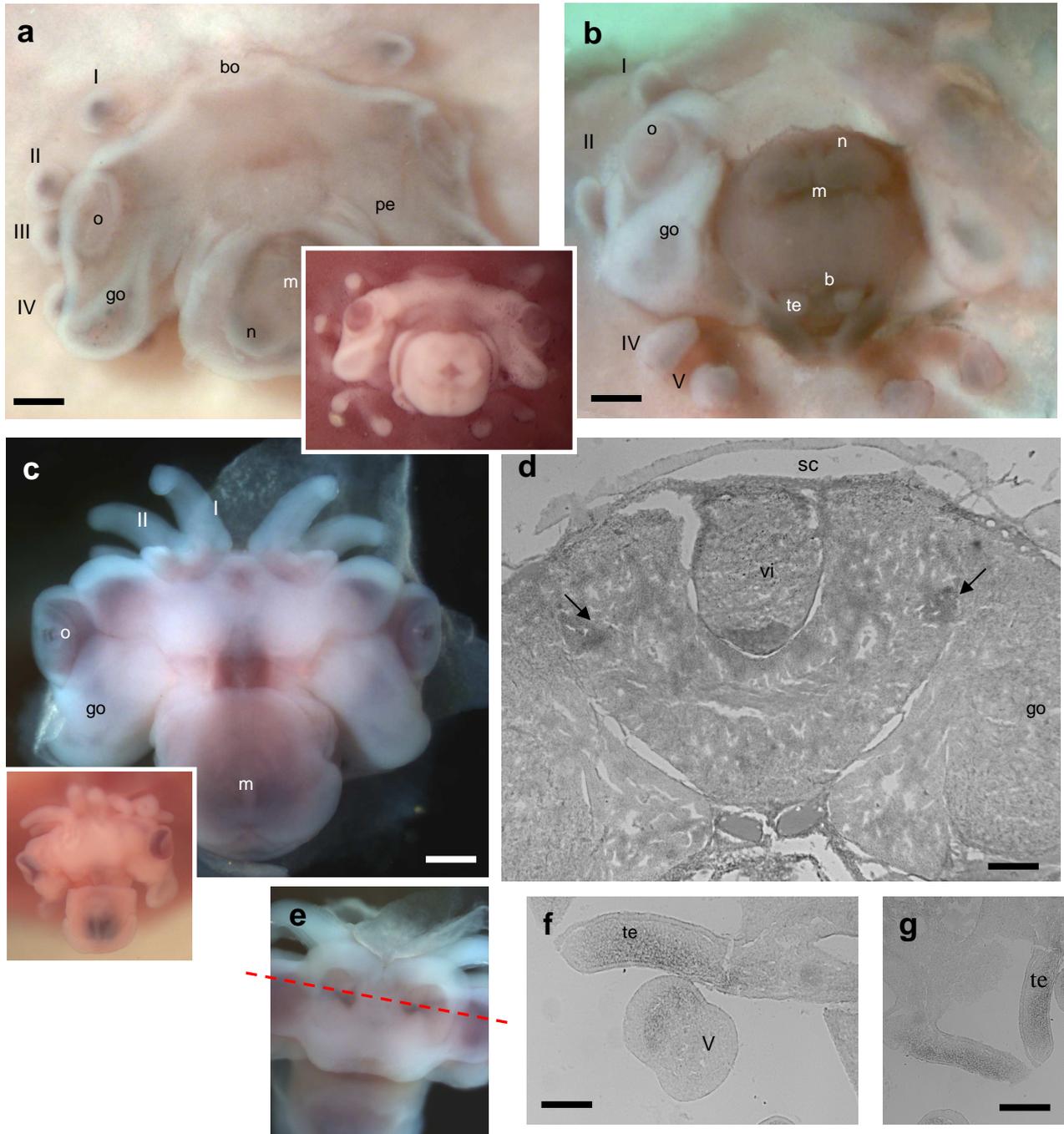


Figure 20 : Expressions de *Pax2/5/8* pendant l'organogénèse de *S. officinalis*. Hybridations *in situ in toto*. Echelle 500µm. Encarts : témoins. **a**, stade 20 ; **b**, stade 21 ; **c**, stade 23 ; **e**, agrandissement de la zone de la tête en vue dorsale de l'embryon photo **c** ; **d**, **f**, **g**, sections au cryostat d'une épaisseur de 20 µm (niveaux de sections indiqués en pointillés rouges).

Légende : I, II, III, IV et V, bras ; b, branchie; bo, bouche ; go, ganglion optique ; m, manteau ; o, œil ; sc, sac coquillier ; te, tube de l'entonnoir ; vi, vitellus.

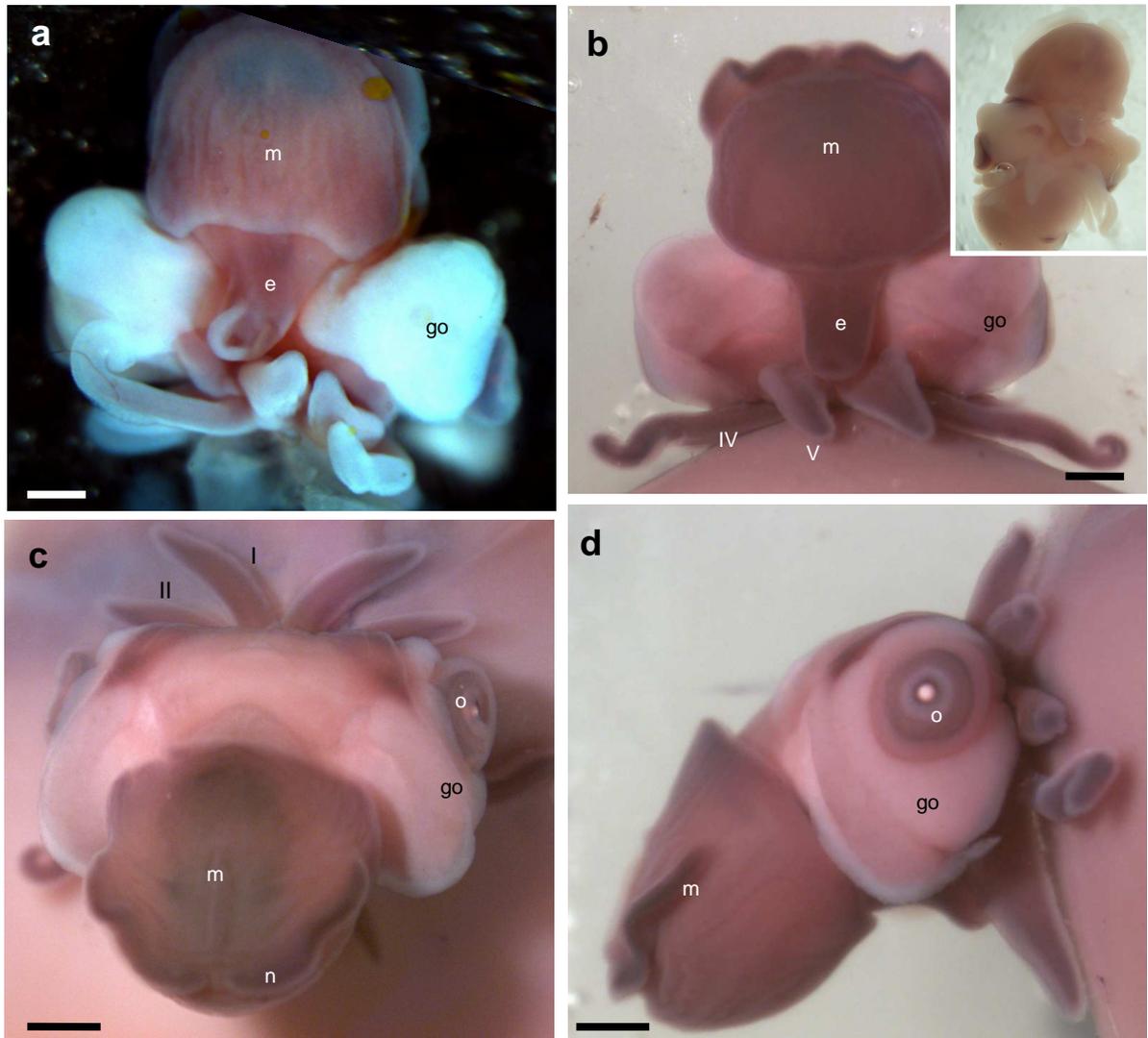


Figure 21 : Expressions de *Pax2/5/8* pendant l'organogenèse tardive de *S. officinalis*. Hybridations *in situ in toto*. Echelle 1mm. **a**, stade 24, vue ventrale ; **b**, stade 25, vue ventrale ; **c**, stade 25, vue apicale **d**, stade 25, vue latérale ; encart : témoin.

Légende : I, II, III, IV et V, bras ; e, entonnoir ; go, ganglion optique ; m, manteau ; o, œil.

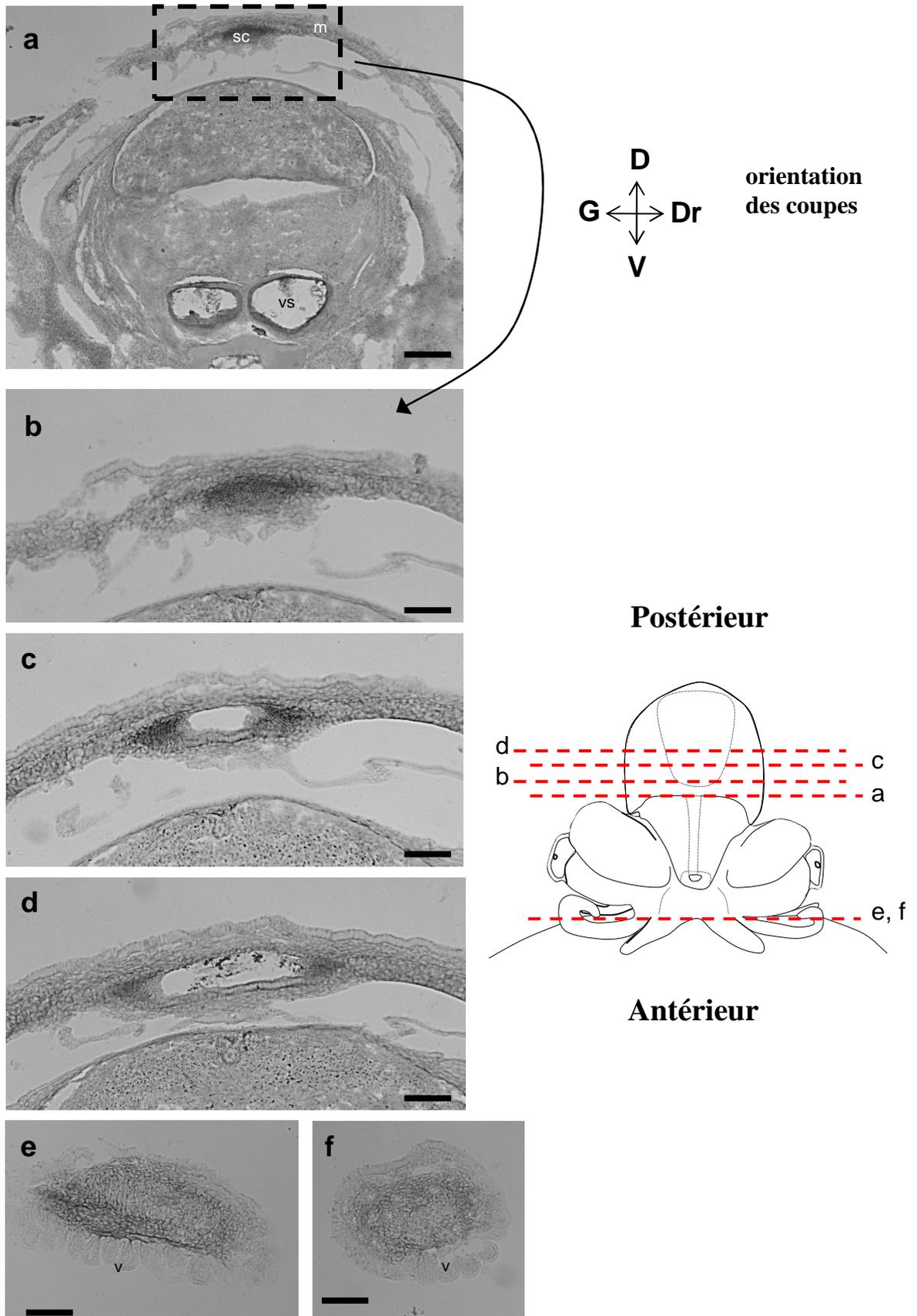


Figure 22 : Expressions de *Pax2/5/8* pendant l'organogenèse de *S. officinalis*. **a** à **d**, au niveau du sac coquillier, dans le sens antérieur à postérieur ; **e**, **f**, au niveau des bras. Hybridations *in situ in toto* suivie par des sections transversales de 20 µm au cryostat, d'un embryon stade 25. Echelle 100µm. Les niveaux de sections sont indiqués en pointillés rouges sur un schéma d'embryon en vue ventrale.

Légende : m, manteau ; sc, sac coquillier ; A, antérieur ; D, dorsal ; Dr, droite ; G, gauche ; P, postérieur ; V, ventral.

L'implication majeure de PAX2/5/8 dans des structures musculaires chez *S. officinalis* est surprenante. En effet, c'est la première fois que ce gène montre une expression principalement mésodermique pendant le développement d'une espèce. Le gène *Pax2/5/8* a été déjà caractérisé dans trois autres Lophotrochozoaires : *Haliotis asinina* (O'Brien and Degnan, 2000), le polychaete *Platynereis dumerilii*, et la sangsue *Helobdella* (Shankland et al., comm. pers., 2010). Un seul Mollusque a fait l'objet de l'élaboration d'un pattern d'expression de *Pax2/5/8*. Il s'agit du Gastropode *Haliotis asinina*, chez lequel un marquage au niveau des statocystes a été décelé, ainsi qu'une expression dans une zone latéropostérieure du pied, les muscles de la coquille et dans la cavité palléale (O'Brien and Degnan, 2003). Nous avons donc une expression de *Pax2/5/8* au niveau de structures musculaires chez deux Mollusques. Ceci nous incite à penser que ce gène a pu être recruté dans la branche des Mollusques pour la mise en place du pied ou de structures dérivées du pied, bras et tube de l'entonnoir pour *S. officinalis*. De même, l'expression de *Pax2/5/8* au niveau du sac coquillier chez *S. officinalis* d'une part, et au niveau de la chambre palléale d'*H. asinina* d'autre part, suggère un rôle commun dans la délimitation de la cavité palléale pour ce gène. Chez le Lophotrochozoaire Annélide, *Helobdella sp.*, *Pax2/5/8* s'exprime de façon tardive pendant le développement dans la chaîne nerveuse ventrale (Shankland et al., comm. pers., 2010). Cependant, une expression mésodermique, principalement dans la néphridie, a été également détectée, et ce, de façon beaucoup plus précoce. Jusqu'ici, seule une expression très restreinte au niveau du mésoderme intermédiaire a été montrée chez un Vertébré, le poisson-zèbre *Danio rerio*, pour les gènes *Pax2* et *Pax8* qui s'y co-expriment (Drummond, 2003). Cependant, ce feuillet mésodermique est à l'origine du rein et des uretères, ce qui exclut une quelconque intervention dans des muscles à destinée locomotrice, autrement dit, les muscles squelettiques chez les Vertébrés. Le gène *Pax2/5/8* aurait donc été recruté dans la branche des Lophotrochozoaires pour la mise en place de tissus mésodermiques (*Helobdella* : Shankland et al., comm. pers., 2010). Au sein des Mollusques, ce gène aurait vu son expression au niveau mésodermique s'élargir à des structures musculaires majeures comme le pied mais, de façon restreinte, à certaines zones (*Haliotis* : O'Brien and Degnan, 2003). Dans la lignée des Céphalopodes, ce rôle aurait donc été conservé et étendu dans toutes les structures dérivées du pied, tube de l'entonnoir et bras. Cette extension de l'expression de *Pax2/5/8* dans les structures musculaires du pied s'est élargie à des territoires nerveux, à savoir les ganglions pédieux. Le lien entre ce gène et le pied n'est pas

seulement histologique, mais concerne l'intégralité de la structure, tissus musculaires et nerveux. De plus, alors que l'expression de *Pax2/5/8* ne concerne que certains muscles attachés à la coquille chez *Haliotis*, elle concerne l'intégralité de la couche musculaire du manteau chez *S. officinalis*. Là encore, on constate une extension de l'expression et, probablement, du rôle de *Pax2/5/8* dans cette structure homologue dans la lignée de *S. officinalis*.

5. *Pax2/5/8* et *NK4*, une complémentarité dans la mise en place de structures à destinée locomotrice

5.1. La mise en place des bras, une collaboration de plusieurs gènes

On peut noter la complémentarité des expressions de *Pax2/5/8* et de *NK4* au niveau des bras (fig. 23). En effet, à des stades précoces, 16 à 18, *NK4* s'exprime sur les faces « externes » des bourgeons (fig. 16a, 16b, et 17e, flèche) tandis que *Pax2/5/8* s'exprime dans les faces « internes » (fig. 19a). Tous deux s'expriment dans les tissus mésodermiques. *A priori*, aucune différence de type musculaire n'a été observée entre ces deux côtés et aucune explication n'a été proposée au sujet de l'existence des stades « bilobés » pour les bourgeons des bras à des stades précoces. Un éventuel rôle dans l'orientation de ces structures musculaires n'est pas à exclure pour *NK4* et *PAX2/5/8*. Entre les stades 21 et 24, l'intensité du marquage *NK4* est progressivement réduite et reste restreinte aux côtés dorsaux des bourgeons brachiaux, comme visible sur les coupes. A partir du stade 24, *NK4* ne s'exprime plus dans les bras, tandis qu'au stade 25, *Pax2/5/8* s'exprime de façon particulièrement intense du côté des ventouses, comme on peut l'observer sur les coupes (fig. 22e et 22f). On peut émettre l'hypothèse que les côtés dits « ventraux » des bourgeons des bras aux stades précoces pourraient être les territoires présomptifs de la future zone adjacente aux ventouses.

Un troisième gène a montré une expression au niveau des bras pendant le développement de *S. officinalis*. Il s'agit du gène *Shh*, qui s'exprime dans les bourgeons des bras du stade 16 au stade 21 (Navet et al., 2010). Il a été montré que le gène *hedgehog* (*hh*) stimulait la myogenèse chez les téléostéens et amniotes (Feng et al., 2000 ; Pirskanen

et al., 2000; Martin et al., 2007). L'expression chez *S. officinalis* pourrait être attribuée à un rôle analogue de *Shh*. Les tentacules et bras des Céphalopodes sont composés respectivement de muscles à striation transversale et oblique (Kier and Schachat, 2008). Cependant, Grimaldi et al. (2008) ont reporté une expression d'un homologue de *Shh* dans une population spécifique de myoblastes qui se différencient en fibres radiales dans les tentacules de *S. officinalis*, ce qui conforte l'hypothèse d'une implication de *Shh* dans la formation de muscles striés chez la seiche. Toutefois, aucune différence d'expression de *Shh* n'a été observée entre les bras IV, futurs tentacules et les autres bras alors que leurs types musculaires sont différents. De ce fait, ces résultats ne confirment pas une expression de *Shh* spécifique aux myoblastes des muscles des tentacules.

D'après Boleztky (1993), tous les bras sont homologues et suivent un développement identique. Les bras IV se spécifient en tentacules à un stade relativement tardif, au stade 26. A ce stade, le nombre de ventouses devient plus important à la base de ces bras. Aucune différence d'expression des gènes étudiés n'a été notée entre les bras IV, futurs tentacules, et les autres bras pendant le développement de *S. officinalis*, suggérant que la spécification de ces bras modifiés ne dépend pas de ces gènes et a lieu effectivement de façon plus tardive. Les tentacules étant déjà différenciés à éclosion, le processus de différenciation a lieu avant. On peut distinguer la formation d'une structure en massue, caractéristique des tentacules, au niveau des bras IV dès le stade 25. D'autres gènes interviendraient donc dans la mise en place de ces structures, en parallèle d'une expression de *NK4* et *Pax2/5/8* qui concernent tous les bras sans distinction. Néanmoins, il n'est pas impossible que le fondement moléculaire soit le même pour tous les bras pendant une très grande partie de l'embryogenèse. *S. officinalis* est un Coléioide Decabrachia. Les Decabrachia sont en fait les seuls Céphalopodes à posséder cette quatrième paire de bras différenciée en tentacules. Cette spécification, très secondaire dans la lignée des Céphalopodes, n'a peut être pas nécessité de modifications moléculaires fondamentales, notamment durant l'embryogenèse précoce. Les mécanismes moléculaires à l'origine de cette spécification des bras IV en tentacules chez les Decabrachia interviendraient probablement dans les stades précédant cette différenciation, à savoir entre les stades 20 et 25.

S. officinalis
stade 18

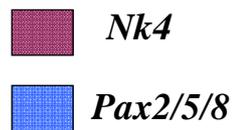
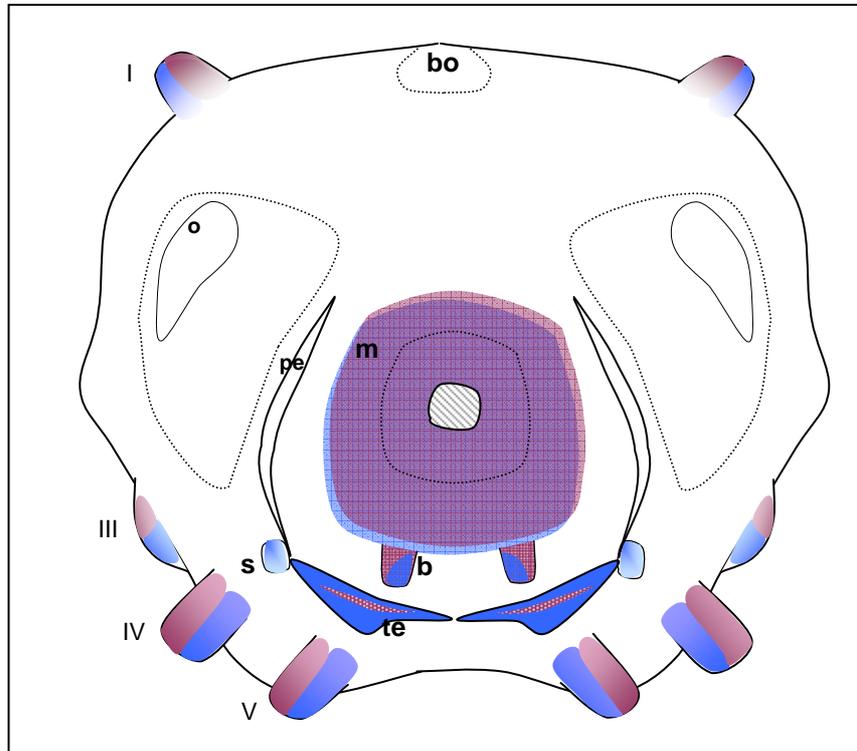


Figure 23 : Schéma d'un stade 18 de l'embryogenèse de *S. officinalis*, zones d'expressions de *NK4* et *Pax2/5/8*.

Légende : I, II, III, IV et V, bras ; b, branchie; bo, bouche ; m, manteau ; o, œil ; pe, poche de l'entonnoir ; s, statocyste ; sc, sac coquillier ; te, tube de l'entonnoir.

5.2. Le manteau et le sac coquillier

NK4 et *Pax2/5/8* sont exprimés au niveau du manteau à des stades précoces, soit 16 à 19 (fig. 15, 16, 19). L'intensité de marquage est cependant plus forte pour *NK4* dont l'expression couvre de façon égale toute cette zone (fig. 15 et 16). Ceci à la différence de *Pax2/5/8* qui accuse une plus forte intensité au niveau des bords du manteau et du sac coquillier (fig. 19a et 20a). *NK4* se maintient de façon importante dans le manteau jusqu'au stade 27, alors que l'expression de *Pax2/5/8* dans cette structure, très importante au stade 25 (fig. 21b), baisse très rapidement d'intensité par la suite. Son expression se restreint ensuite au sac coquillier comme visible sur les coupes (fig. 22a à 22d). Le rôle potentiel de *NK4* dans la myogenèse du manteau semble plus important que celui de *PAX2/5/8* qui pourrait avoir un rôle plus localisé dans le sac coquillier.

D'autres gènes sont connus pour intervenir dans la formation de structures en lien avec la coquille ou dans celle de la coquille elle-même. C'est le cas du gène *engrailed*, qui s'exprime à la marge de la future coquille chez un grand nombre de Mollusques (Jacobs et al., 2000 ; Moshel et al., 1998). En 2007, Baratte et al. ont observé par immunodétection la présence d'*Engrailed* dans le manteau et dans toute la zone du sac coquillier dès leur apparition, au stade 16. Le rôle d'*Engrailed* dans la coquille externe des Mollusques semble donc avoir été conservé chez les Céphalopodes, malgré l'internalisation de la coquille. *Engrailed* ne présentait plus d'expression dans le sac coquillier, alors que la formation de la coquille débutait. Cette protéine serait donc impliquée uniquement dans la délimitation du compartiment coquillier.

Ainsi, la formation du sac coquillier entourant la coquille interne chez les Coléoides et ici chez *S. officinalis*, dépend de gènes qui montrent des rôles dans des structures similaires, formation du sac coquillier et de cavités plus généralement, chez d'autres groupes. Les fonctions de *PAX2/5/8* et *Engrailed* semblent donc avoir été conservées au sein des Mollusques.

5.3. L'entonnoir, quand les gènes appuient les différences d'origine entre les poche et tube (fig. 1)

Contrairement à *NK4*, *Pax2/5/8* s'exprime de façon très précoce, dès le stade 17, dans les structures qui donneront le tube de l'entonnoir (fig. 19b). *NK4* ne montre qu'une expression faible au stade 18 (fig. 16f), et toujours dans les zones (territoire présomptif) du tube de l'entonnoir, jusqu'au stade 20 (fig. 17a). Dans les deux cas, l'expression des gènes ne concerne donc que le tube et non la poche de l'entonnoir, à la différence du marquage montré par immunodétection de la protéine Engrailed, dans les tubes mais aussi dans les poches de l'entonnoir du stade 16 au 18 (Baratte et al., 2007). Le tube de l'entonnoir a pour origine le Céphalopodium, tandis que la poche a une origine palléoviscérale (Boletzky, 1988b). La poche de l'entonnoir nécessiterait donc l'intervention d'autres gènes pour sa formation, appuyant la différence d'origine avec une différence au niveau du contrôle moléculaire du développement de ces deux structures fonctionnellement liées, mais distinctes morphologiquement lors du développement précoce. Il semblerait qu'il y ait une forte composante entre l'origine du tissu (trace embryonnaire) et l'expression génique. Ce n'est cependant pas le cas au niveau des bras où aucune différence d'expression n'a pu être observée entre les bras et les tentacules (bras IV).

Les expressions de *NK4* et *Pax2/5/8* au niveau des bras et dans le tube de l'entonnoir confirment aussi une implication de ces gènes dans des structures dérivées du pied des Mollusques. Une autre hypothèse a été proposée concernant l'origine des bras et entonnoir des Céphalopodes. En se fondant sur les schémas d'innervation et les traces musculaires sur la coquille, Yochelson et al. (1973) suggèrent que les bras seraient dérivés de la tête et de la zone antérieure du pied des Mollusques, tandis que l'entonnoir serait dérivé du seul pied. Dès 1928, Naef avait, quant à lui, proposé uniquement le pied comme origine des bras et de l'entonnoir des Céphalopodes. Cette hypothèse a été, depuis, reprise par Boletzky (1988a, 2003). Les résultats obtenus avec la présente étude sur le pattern d'expression de *Pax2/5/8* appuient fortement cette seconde hypothèse. Les expressions majeures de ce gène dans le tube de l'entonnoir et les bras pendant le développement de *S. officinalis*, confrontées à l'expression détectée dans le pied du Mollusque *Haliothis asinina* (O'Brien and Degnan, 2003) laissent penser que les bras et entonnoir seraient dérivés uniquement du pied. La poche n'étant pas marquée par *Pax2/5/8*, son origine ancestrale peut être remise en cause comme différente de celle du tube. Chez *Nautilus*, l'entonnoir

semble se former de façon similaire aux Coléoides. Néanmoins, en 2008, Shigeno et al. ne distinguent pas de poche et de tube dans son article traitant de l'origine du complexe de la tête des Céphalopodes. Les photos d'un embryon de *Nautilus pompilius* montrent pourtant le futur entonnoir dans la même disposition que la même structure chez la seiche à un stade équivalent. On peut y observer des structures paires de chaque côté du manteau fusionnées avec deux autres structures se situant en dessous des branchies. Cela laisse penser que la poche d'un côté et le tube de l'autre étaient présents avant la divergence des Coléoides.

L'entonnoir est un assemblage ultérieur de deux structures qui se mettent en place de façon différente. Au cours de l'évolution, si l'unique pied des Mollusques s'est modifié en plusieurs bras et en un entonnoir, cette modification n'a peut-être concerné que le tube, tandis que la poche serait apparue postérieurement. Cette structure pourrait ne pas être dérivée du pied mais aurait été annexée ensuite au tube pour former l'entonnoir.

Si les expressions de *NK4* et *Pax2/5/8* concernent les mêmes structures musculaires, à savoir le manteau, les bras et l'entonnoir (fig. 23), elles ne sont pas identiques pour autant. En effet, *Pax2/5/8* semble particulièrement important dans la formation de l'entonnoir, tandis que l'expression de *NK4* se maintient de façon très intense dans l'intégralité de la zone du manteau du début jusqu'à la fin du développement, excepté dans les tout derniers stades avant éclosion. Dans les bras, leurs expressions respectives se complètent du point de vue spatial, en particulier, au début du développement, mais également du point de vue temporel, avec l'absence de marquage concernant *NK4* à partir du stade 24 et une expression importante pour *Pax2/5/8* au stade 25. *NK4* et *PAX2/5/8* pourraient donc se compléter pour la mise en place des principales structures musculaires intervenant dans la locomotion. Ces deux gènes ont pu participer au développement des muscles locomoteurs parallèlement à la régression de la coquille protectrice et ainsi participer aux mécanismes moléculaires qui ont permis une adaptation optimale au milieu aquatique (fig. 24).

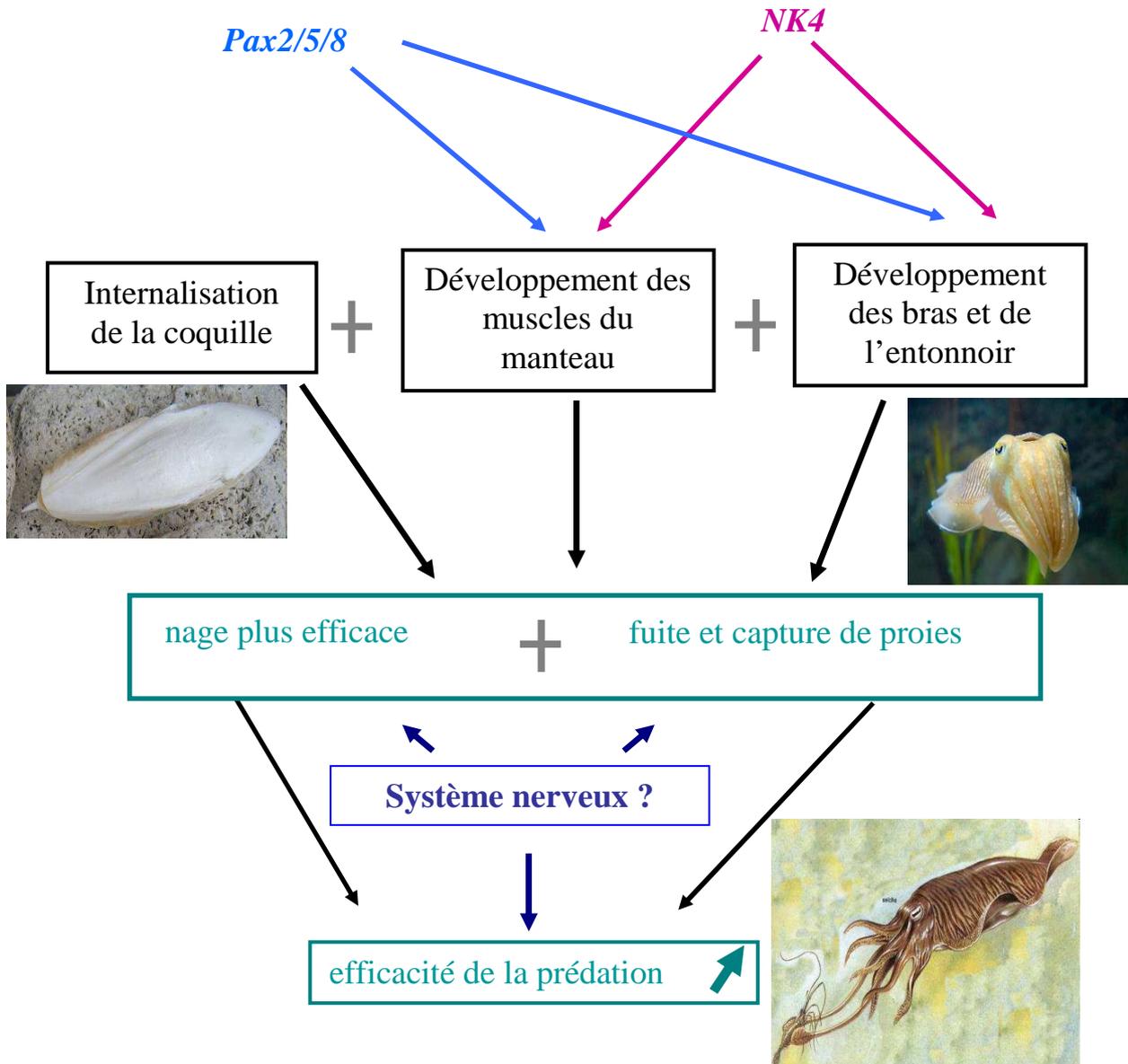


Figure 24 : Scénario possible de l’internalisation de la coquille en parallèle au développement musculaire chez *S. officinalis* au cours de l’Évolution.

6. *Pax3/7*, un troisième gène impliqué dans les structures musculaires ?

Chez les Vertébrés, ce sont les gènes *Pax3* et *Pax7* qui participent principalement à la mise en place des tissus mésodermiques. En effet, s'ils sont exprimés dans le système nerveux central, ils le sont aussi dans les muscles squelettiques (Buckingham and Relaix, 2007). Pendant la myogenèse, *Pax3* et *Pax7* sont exprimés exclusivement dans les cellules à destinée musculaire squelettique (Kassar-Duchossoy et al., 2005). Ces gènes ont des rôles importants dans la régulation des MRFs et, notamment, de MyoD (Relaix et al., 2005). En effet, l'inhibition des gènes PAX3/7 entraîne une déficience sélective de MyoD et Myf5 (Bhagavati et al., 2007). Ces gènes *Pax* seraient les régulateurs les plus précoces de la myogenèse chez les Vertébrés, mais également chez des Lophotrochozoaires. Chez la sangsue *Helobdella*, *Hau-PAX3/7A* est un marqueur précoce du mésoderme et il est impliqué en particulier dans le développement des néphridies ainsi que dans la formation de la cavité palléale (Woodruff et al., 2007). Nous avons trouvé très récemment un cluster d'ESTs correspondant au gène *gooseberry*, l'homologue de *Pax3/7* chez la drosophile. Par conséquent, ce gène pourrait également participer à la mise en place des muscles pendant le développement de *S. officinalis*. Il sera donc indispensable de décrire son pattern d'expression.

Chez *S. officinalis*, *Pax2/5/8* s'exprime de façon majoritaire dans les structures musculaires à destinée locomotrice : bras, manteau et entonnoir. Ces structures, constituées principalement de muscles à striation oblique, peuvent être considérées comme des analogues fonctionnels des muscles squelettiques des Vertébrés, composés de muscles à striation transversale. La présence de *Pax3/7* dans la banque ESTs suggère un rôle possible de ce gène dans la mise en place de structures mésodermiques. Cependant, étant donné les expressions très larges de *NK4* et *Pax2/5/8* au niveau des structures musculaires majeures de *S. officinalis*, il ne serait pas étonnant d'observer une expression restreinte de *Pax3/7* dans ces zones. L'expansion des rôles de *Pax2/5/8* et *NK4* a pu provoquer en parallèle une restriction des rôles d'autres gènes connus chez d'autres espèces pour intervenir dans la myogenèse, tel que *Pax3/7*. Seule une description de son expression au cours du développement de *S. officinalis* pourra trancher cette question.

7. *Paxβ*, grand absent chez les Céphalopodes ?

En 2009, Schmerer et al. caractérisent des gènes, appelés *Paxβ*, chez le Lophotrochozoaire *Helobdella*. Cette famille de gènes est restreinte aux Lophotrochozoaires et des homologues ont pu être identifiés chez l'Annélide *Capitella* sp. I, les Mollusques *Aplysia californica* et *Lottia gigantea*, le plathelminthe *Schmidtea mediterranea*, et caractérisés par PCR pour le némerte *Cerebratulus lacteus* et le brachiopode *Terebratula transversa*. Ce gène serait apparu par duplication des gènes *Pax2/5/8* d'après la grande conservation d'introns communs dans le domaine paired. Il aurait ensuite fortement divergé.

Les deux gènes caractérisés, *Hau-Paxβ1* et *Hau-Paxβ2*, présentent des patterns d'expression similaires durant le développement de la sangsue. Leur expression est très précoce, principalement, dans toutes les couches mésodermiques de l'embryon puis dans de larges zones du système nerveux central (ganglion cérébral). *Paxβ* montre donc un rôle important au niveau mésodermique. Pendant le développement de la sangsue *Helobdella*, plusieurs gènes de la famille *Pax* sont impliqués dans la formation de structures mésodermiques. Il s'agit donc de *Paxβ* (Schmerer et al., 2009), *Pax3/7* (Woodruff et al., 2007) et *Pax2/5/8* (Shankland et al., comm. pers., 2010). Les expressions de *Hau-Paxβ1* et *Hau-Paxβ2* se superposent partiellement au plan temporel et spatial avec des expressions de *Hau-Pax3/7a*. En effet, *Hau-Paxβ1* et *Pax3/7a* sont tous deux exprimés lors du développement précoce dans des cellules primaires mésodermiques et *Hau-Paxβ2* et *Pax3/7a* sont exprimés au cours de la gastrulation dans des structures mésodermiques (Woodruff et al., 2007). De même, et *Pax2/5/8* et *Hau-Pax3/7A* sont impliqués dans la formation des néphridies (Shankland et al., comm. pers., 2010 ; Woodruff et al., 2007), ce qui pourrait suggérer une interchangeabilité possible entre les deux gènes. *Hau-Paxβ1* et *Hau-Paxβ2* seraient, quant à eux, plutôt impliqués dans la formation du proboscis (Schmerer et al., 2010).

Aucun homologue de *Paxβ* n'a pu être identifié dans la banque d'ESTs réalisée à partir d'embryon de *S. officinalis*. Si *Paxβ* a une implication essentielle dans le développement des Lophotrochozoaires, ce gène n'aurait pas pu disparaître chez les Céphalopodes sans qu'un autre gène ne puisse le remplacer ou compenser sa perte. La possible absence de ce gène dans ce groupe pourrait être liée à une extension des fonctions

de *Pax2/5/8* à la myogenèse. De cette façon, des mutations et modifications ont alors pu avoir eu lieu dans la séquence de *Paxβ*, au point que celui-ci perde son rôle sans que cette perte ait entravé le bon développement des Céphalopodes. Cette extension des rôles de *PAX2/5/8* a pu survenir dans l'évolution à un moment où les muscles se sont massivement développés. Alors que la musculature des Céphalopodes se développe, permettant une locomotion adaptée au milieu aquatique, il y a probablement eu concomitamment un recrutement massif de gènes pour l'émergence de structures clés dans la locomotion, manteau, entonnoir et bras. Ce sont là, précisément, les trois structures principales qui expriment *Pax2/5/8*, mais également *NK4*. A ce moment, d'autres gènes ont dû avoir des rôles importants en collaboration avec ces deux gènes, comme, par exemple, *Pax3/7* et *Paxβ*. Cependant, des redondances dans les fonctions de ces gènes ont pu permettre des modifications dans les séquences de certains sans que cela n'affecte la myogenèse. Cela pourrait être le cas pour *Paxβ*, non détectable dans la banque ESTs de *S. officinalis*.

Schmerer et al. avancent l'hypothèse que la distribution phylétique de *Paxβ* restreinte à des Lophotrochozoaires peut être liée à des caractéristiques de ces derniers et, notamment, au clivage spiral lors de leur développement. Les auteurs cités ont réalisé des études fonctionnelles (non publiées) qui tendent à montrer un rôle de *Hau-Paxβ1* dans le programme de clivage spiral d'*Helobdella*. Cependant, cette équipe de recherche a également caractérisé un gène *Paxβ* chez un brachiopode, *Terebratula transversa*, à segmentation radiaire, mais elle n'est pas parvenue à le caractériser chez le trématode *Schistosoma mansoni*, qui, lui, présente une segmentation spirale comme la plupart des Lophotrochozoaires. Ce lien ne peut donc pas être confirmé. Chez *S. officinalis*, dont les œufs, télolécithes, montrent un clivage discoïdal, aucun homologue de *Paxβ* n'a pu être retrouvé dans la banque d'ESTs. La banque ESTs ayant été construite à partir d'embryons des stades 15 à éclosion, on ne peut écarter la possibilité que ce gène soit exprimé avant l'organogenèse, soit des stades 1 à 15.

La diversité dans les modes de développement chez les Lophotrochozoaires ne fait qu'augmenter l'hétérogénéité de ce groupe englobant des formes très variées d'animaux. Les modifications dans les expressions et les fonctions potentielles des gènes *Pax2/5/8*, *Pax3/7* ou *Paxβ* ainsi que leur perte ou apparition dans une lignée montre la plasticité importante de cette famille de gènes qui a sans doute contribué à la diversité phénotypique observée chez les Lophotrochozoaires.

L'absence d'ARN de gènes tels que les *MRFs*, ou *Paxβ* dans la banque ESTs construite à partir d'embryons de *S. officinalis* suggère que ces gènes n'interviendraient pas pendant le développement de *S. officinalis*, qu'ils aient perdu leur fonction ou qu'ils soient absents chez cet organisme. Leurs expressions pourraient aussi être très réduites, ne permettant pas leur détection dans la banque, et leurs rôles plus transitoires. Ces gènes étant des gènes maîtres dans la formation de structures musculaires chez de nombreux autres organismes, il paraît évident que d'autres gènes possèdent des rôles dans la mise en place de tissus mésodermiques. Il semblerait que ce soit le cas pour les gènes *NK4* et *Pax2/5/8* chez *S. officinalis*. C'est la première fois que des expressions aussi importantes et, ainsi, un rôle potentiel dans la mise en place de muscles à fonction locomotrice sont montrés pour *NK4*. Les expressions de *Pax2/5/8* dans les bras et le tube de l'entonnoir suggèrent un rôle conservé au sein des Mollusques. Ce rôle aurait été étendu chez les Céphalopodes dans les structures dérivées du pied non seulement au niveau musculaire, mais aussi, dans des structures nerveuses comme les ganglions pédieux. Le gène *Pax3/7/Gooseberry* serait exprimé au cours de l'embryogenèse chez notre modèle, comme le montre sa détection dans la banque d'ESTs. Reste à savoir dans quel(s) tissu(s) et son importance relative par rapport à *NK4* et *Pax2/5/8*. Dans la lignée des Céphalopodes, fortement divergente par rapport aux autres Mollusques, des recrutements de gènes et réarrangements ont dû se produire, permettant ainsi l'apparition de structures clés dans l'adaptation à la locomotion en milieu aquatique. Cependant, il y a eu aussi conservation des fonctions de certains gènes, tel que *Pax2/5/8* dont le rôle dans la mise en place du pied des Mollusque a été conservé pour les structures dérivées du pied chez *S. officinalis*. Le recrutement pour la différenciation de tissus d'origine mésodermique se serait fait dès la lignée des Lophotrochozoaires.

La locomotion et la prédation dépendent du système nerveux, particulièrement complexe chez les Céphalopodes. Ces fonctions modifiées chez les Céphalopodes par rapport aux Mollusques ne se seraient pas développées sans un système nerveux déjà organisé et efficace permettant une meilleure perception de l'environnement et, ainsi, des réactions rapides et efficaces en réponse aux signaux perçus.

II. Système contrôle de la locomotion, comment se met en place le système nerveux ?

La fonction de locomotion est indissociable du système nerveux. Les mouvements musculaires dépendent du contrôle nerveux initial. L'apparition de structures musculaires dérivées est sans doute liée à des modifications du système nerveux afférent. Chez les Céphalopodes, les fonctions motrices sont assurées principalement par la masse sous-oesophagienne du cerveau. Elle va mettre en œuvre notamment les lobes brachiaux, associés à 10 nerfs, un pour chaque bras et tentacule, et les lobes pédieux, impliqués dans les mouvements des bras, des tentacules et des nerfs de l'entonnoir. La masse supra-oesophagienne reçoit principalement des afférences sensorielles. On sait cependant que les lobes basaux seraient impliqués dans le mouvement des bras, tentacules et nageoires ainsi que dans le contrôle de la respiration et de la nage (Chichery and Chanelet, 1978). Ces lobes, fonctionnellement hiérarchisés, ne constituent qu'une petite partie du cerveau complexe des Céphalopodes. Si la mise en place de cette structure, convergence majeure avec les Vertébrés, a déjà été bien décrite au cours du développement, l'étude des mécanismes moléculaires sous-jacents en est encore aux prémices. Il s'agit pourtant de phénomènes fondamentaux qui restent à élucider pour comprendre l'émergence des structures clés de la locomotion au cours de l'évolution.

1. *Pax6* et *Shh*, des gènes impliqués dans la formation du système nerveux central et périphérique

Nous avons établi les patterns d'expression des gènes *shh* et *Pax6* pendant le développement de *S. officinalis*, et plus précisément, pendant la phase d'organogenèse, des stades 15 à éclosion (Lemaire, 1970). Cette étude a fait l'objet d'une publication en 2009 : « *Shh* and *Pax6* have unconventional expression patterns in embryonic morphogenesis in *Sepia officinalis* (Cephalopoda) ».

1.1. La mise en place des ganglions, une coopération entre *Pax6* et *shh*

Pendant l'embryogénèse chez *S. officinalis*, l'expression de *Pax6* est visible dans les territoires présomptifs de plusieurs ganglions. En premier lieu, les ganglions optiques à des stades très précoces, dès le stade 15, au début de l'organogenèse (fig. 25b), puis l'expression s'étend, à partir du stade 19, aux territoires présomptifs des ganglions cérébroïdes et palleoviscéraux (fig. 25h) qui formeront le cerveau, et se maintient jusqu'au stade 21 (fig. 26b). Ces expressions ganglionnaires ont déjà été observées chez d'autres Céphalopodes : *Euprymna scolopes* (Hartmann et al., 2003) et *Loligo opalescens* (Tomarev et al., 1997). Cela suggère que *Pax6* est très fortement lié à la formation du SNC, dont le cerveau chez les Céphalopodes. Cette implication de *Pax6* dans l'organisation cérébrale a déjà été montrée dans d'autres groupes, parmi lesquels les Vertébrés. Chez la souris, *Pax6* a montré un rôle dans le patterning du cerveau. En effet, *Pax6* est exprimé au niveau de la frontière entre le cerveau antérieur et le cerveau postérieur (Matsunaga et al., 2000). Un tel rôle de délimitation de territoires nerveux est possible au niveau du cerveau de *S. officinalis* ; *Pax6* pourrait avoir une fonction dans l'organisation des différents ganglions.

Shh montre, quant à lui, des expressions plus restreintes et plus transitoires. Des stades 18 à 20, *Shh* s'exprime en bordure de toute la zone optique, longeant les côtés externes des poches de l'entonnoir et entre les yeux et la couronne brachiale, en s'étendant vers le côté ventral (fig. 25d et 25g, pointes de flèches).

Shh

Pax6

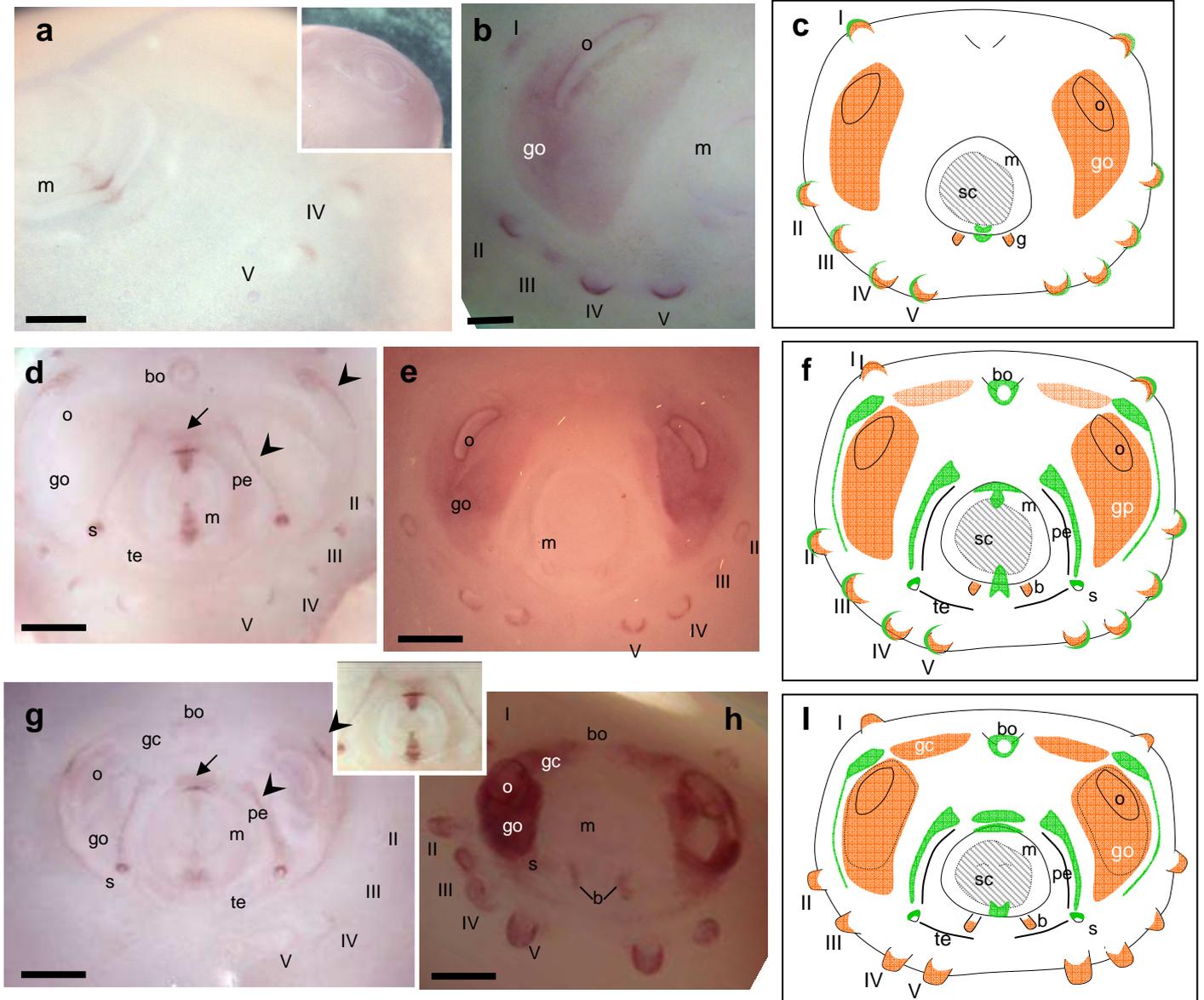


Figure 25 : Expressions de *Shh* et *Pax6* pendant l'organogénèse précoce de *S. officinalis*. Hybridations *in situ in toto*. Colonne de droite : schémas d'embryons stades précoces, zones d'expressions de *Pax6* et *shh*. Echelle 500µm. Vues apicales. **a, b, c**, stade 16 ; **d, e, f**, stade 18 ; **g, h, i**, stade 19 ; encart sur photo a, témoin.

Légende : I, II, III, IV et V, bras ; b, branchie ; bo, bouche ; gc, ganglion cérébroïde ; go, ganglion optique ; m, manteau ; o, œil ; pe, poche de l'entonnoir ; s, statocyste ; sc, sac coquillier ; te, tube de l'entonnoir.

Si l'on compare les expressions de *shh* et *Pax6*, on constate qu'elles ne se superposent pas (fig. 25c, 25f, 25i). Au stade 23, *Pax6* est exprimé au niveau des ganglions supra-œsophagiens (fig. 26e, flèche courte), zone qui ne se superpose pas à la coloration *Shh* (fig. 26d, flèche courte) qui concernerait les cotés dorsaux et ventraux de l'œsophage (fig. 28a, flèches fines). De façon similaire, l'expression de *Pax6* couvre les ganglions optiques et cérébroïdes du stade 16 au 25 (fig. 25, 28, 29), tandis que *shh* montre une expression en bordure des tubes de l'entonnoir et entre les yeux et la couronne brachiale, s'étendant vers la face ventrale de l'embryon (fig. 25d et 25g, pointes de flèches). *Pax6* fait partie des gènes dits de classe I, inhibés par SHH chez les Vertébrés (Jacobs et Briscoe, 2003). De plus, il a été montré chez la souris et chez un Lophotrochozoaire, *Platynereis*, que *Pax6* ne s'exprimait pas dans les zones d'expression de *NK2*, activé en amont par *Shh* (souris : Ericson et al., 1997b ; *Platynereis* : Denes et al., 2007). Cela concorde avec le fait que chez *S. officinalis*, *Shh* ne montre pas d'expression dans les ganglions où s'exprime *Pax6*. Comme *Shh* encercle les ganglions optiques et cérébroïdes, ce gène pourrait avoir un rôle dans la délimitation des ganglions pendant leur condensation et différenciation pour constituer le futur cerveau de *S. officinalis*.

Il a été montré que PAX6 régule l'expression de *Nkx2.2* au niveau de la corde neurale de la souris, établissant ainsi l'identité de populations distinctes de futurs motoneurons et interneurons (Ericson et al., 1997b). Il semblerait qu'il existe une inhibition réciproque des deux gènes dont les expressions s'excluent. Le gradient de concentration de SHH qui s'établit à partir de la zone ventrale de la corde spinale régule les différents domaines d'expression de facteurs de transcription. SHH active l'expression de gènes dits de classe I, dont fait partie *NK2*, et inhibe celle des gènes de classe II, dont *Pax6*, suivant ses concentrations. Ces différents gènes définissent leurs domaines d'expression via des régulations négatives en feed-back, l'un inhibant l'autre et *vice versa*. C'est le cas pour les gènes *NK2* et *Pax6*. En effet, *NK2* inhibe l'expression de *Pax6* qui inhibe *NK2* en retour, définissant ainsi des frontières précises entre leurs zones respectives d'expression (Jacob and Briscoe, 2003). Il y a donc deux étapes concernant l'organisation de la corde neurale chez les Vertébrés. En premier lieu la diffusion de SHH à partir de la zone ventrale permet l'expression de *NK2* et inhibe en parallèle celle de *Pax6*. Au niveau intracellulaire, les cellules les plus éloignées du gradient de SHH vont produire PAX6, tandis que celles en contact avec une forte dose de SHH vont produire *NK2* qui, à son tour,

inhibe la production de PAX6, permettant ainsi la mise en place d'une frontière précise entre les domaines NK2 positifs au niveau ventral et les domaines PAX6 positifs au niveau dorsal.

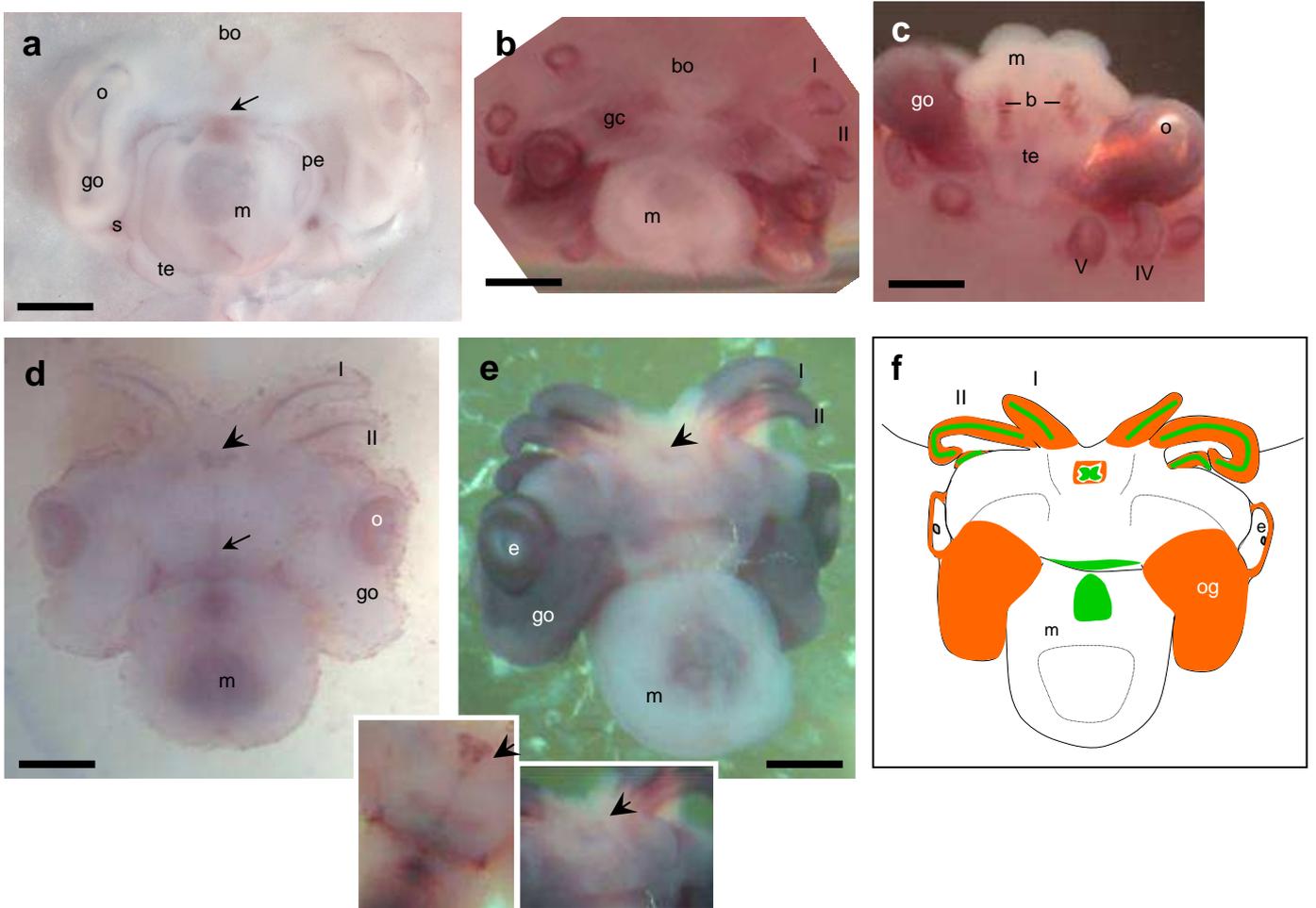


Figure 26 : Expressions de *Shh* et *Pax6* pendant l'organogénèse de *S. officinalis*. Hybridations *in situ in toto*. Echelle 500µm. **a**, expression de *shh*, stade 20, vue apicale ; **b**, expression de *Pax6* stade 21, vue dorsale ; **c**, expression de *Pax6* stade 21, vue ventrale ; **d**, expression de *shh*, stade 23, vue dorsale ; **e**, expression de *Pax6*, stade 23, vue dorsale ; **f**, schéma d'un stade 23 et superposition des marquages *shh* et *Pax6* ; encarts : agrandissements des photos d et e.

Légende : I, II, III, IV et V, bras ; b, branchie; bo, bouche ; gc, ganglion cérébroïde; go, ganglion optique ; m, manteau ; o, œil ; pe, poche de l'entonnoir ; s, statocyste ; te, tube de l'entonnoir.

D'après Anton Dohrn (1875), l'ancêtre des Vertébrés a subi une inversion dorso-ventrale de son corps. Des formes de transition, hémisessiles, auraient changé d'orientation vis-à-vis de leur substrat. Lorsque ces espèces Vertébrés auraient quitté leur substrat et adopté alors un mode de vie vagile, leur nouvelle orientation aurait été fixée, avec un SN dorsal. Cette théorie soutenant une homologie entre le SNC ventral des non-Vertébrés et le SNC dorsal des Vertébrés est appuyée par Arendt et Nübler-Jung (1994). L'équipe d'Arendt a montré que le neuroectoderme de *Platynereis* est subdivisé en différents domaines par des zones d'expression de gènes *NK* et *Pax*, *NK2* et *Pax6*, en particulier, qui se superposent partiellement (fig. 27). Ces domaines correspondent à des zones du tube neural des Vertébrés exprimant des gènes homologues (Denes et al., 2007).

Il semble peu probable que cette cascade moléculaire, dans ce même ordre d'intervention des gènes, ait évolué plusieurs fois de façon indépendante. Cependant, on peut se poser la question de la nécessité que ces gènes aient été cooptés. Si le lien moléculaire, au sein d'une même cascade, ne peut être nié, ils ont également des fonctions respectives, *a priori* indépendantes des autres gènes dans diverses structures. En effet, PAX6, par exemple, a des fonctions majeures dans la formation de l'œil, aussi bien chez les Vertébrés et les Ecdysozoaires, que chez les Céphalopodes.

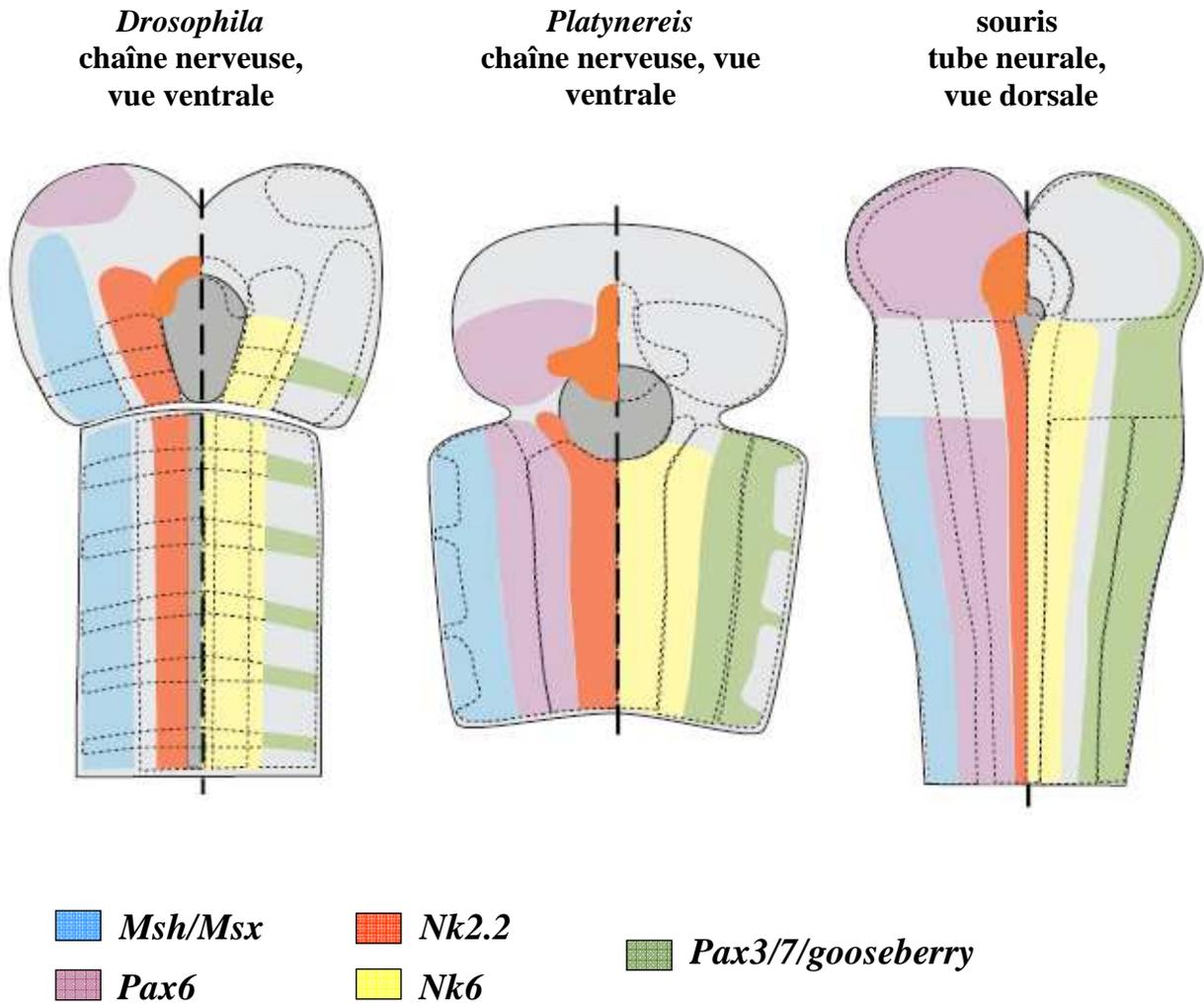


Figure 27 : Comparaison des colonnes neurogéniques médiolatérale de *Drosophila melanogaster* (Ecdysozoaire, Arthropode), *Platynereis dumerilii* (Lophotrochozoaire, Annélide) et *Mus musculus* (Vertébré, Mammifère). Zones d'expression de *Msh/Msx*, *Pax6*, *Nk2.2*, *Nk6* et *Pax3/7/gooseberry*. Tous les patterns d'expression sont symétriques mais sont représentés ici sur un seul côté pour être plus compréhensibles. D'après Arendt et al., 2008.

1.2. *Shh* et *Pax6* participent tous les deux à l'organogenèse des bras

Shh est exprimé au niveau des nerfs brachiaux et, plus précisément, dans la couche ganglionnaire du cordon nerveux, du stade 21 au stade 30 (fig. 26d, 28, flèche courte, 29a à 29c). Cela concorde avec un signal “*Hh-like*” détecté dans la corde nerveuse brachiale dans la même espèce aux stades 26 et 29 (Grimaldi et al., 2008). De plus, dans les stades précoces, un marquage est observé dans les bourgeons des bras, sur le côté externe au disque embryonnaire (fig. 25a et 25d). Les bras sont considérés comme dérivés du pied de l'ancêtre putatif des Mollusques (Naef, 1923 ; Boletzky, 1988a). Aucune expression de *shh* n'a été montrée dans le pied d'un Mollusque auparavant. De ce fait, tout comme le gène *engrailed* (Baratte et al., 2007), *shh* a pu être recruté pendant l'émergence de cette synapomorphie des Céphalopodes.

L'expression de *shh* dans les bourgeons des bras est concomitante avec une expression de *Pax6*. En effet, *Pax6* est exprimé dans les bras du stade 16 à 26. Dans les stades précoces, 15 à 20, la coloration couvre les bourgeons avec une plus forte intensité sur les bords (fig. 25b, 25e, 25h, 26b). Puis, dans les stades plus tardifs, 24 à 27, alors que les bras prennent du volume, l'intensité devient plus importante au niveau ventral, autour des ventouses (fig. 29f), une zone riche en neurones chimio et mécanosensoriels.

Shh et *Pax6* semblent avoir des rôles complémentaires dans la formation des bras pendant l'embryogenèse de *S. officinalis*. *Shh* pourrait participer à la formation de différentes structures dans les bras, comme suggéré par ses deux expressions dans les bras, d'abord entourant les bourgeons pendant l'embryogenèse précoce, puis dans les nerfs brachiaux aux stades tardifs. Quant à *Pax6*, il pourrait intervenir au niveau de la partie sensorielle des bras, notamment les ventouses, dès qu'elles sont discernables, c'est-à-dire au stade 24.

1.3. *Shh* et *Pax6* sont impliqués dans la formation d'organes sensoriels

Chez *S. officinalis*, l'expression de *Pax6* dans les yeux commence dès le début de l'organogenèse, au stade 15 (fig. 25b). A ce stade, le contour de la vésicule optique ainsi que les territoires présomptifs des ganglions optiques sont marqués. Cette expression persiste jusqu'aux stades tardifs (fig. 29e). Cela concorde avec l'expression de *Pax6* observée dans la région au stade 14 de *Loligo opalescens* (Tomarev et al., 1997) et au même stade chez *Euprymna scolopes* (Hartmann et al., 2003). Dans tous les cas, l'expression de *Pax6* précède la différenciation de l'œil, ce qui suggère que chez les Céphalopodes, PAX6 pourrait être à l'origine de la cascade moléculaire conduisant à la prolifération et à la différenciation des cellules primordiales des yeux. Le rôle de *Pax6* dans les organes photosensibles a été largement étudié chez les Métazoaires (pour revue : Callaerts et al., 1997). La fonction de *Pax6* dans la formation des organes photosensibles, quel qu'en soit le degré de complexité, semble être indubitablement conservé.

Deux structures sensorielles spécifiques des Céphalopodes expriment *shh* pendant le développement chez *S. officinalis*. Du stade 16 au stade 18, les statocystes, des structures mécanoréceptives, sont colorés en arc de cercle sur le côté dorsal (fig. 25d et 25g). Ce marquage se maintient jusqu'au stade 23 comme visible sur les coupes (28b et 28c, pointe de flèche). Du stade 18 à 20, une coloration est observable entre les deux poches de l'entonnoir (fig. 25d et 25g, flèches). Elle se maintient jusqu'à des stades avancés (fig. 26a et 26d). Cette expression serait située au niveau du territoire présomptif de l'organe nuchal, une structure mécanoréceptive composée de cellules ciliées, impliquées dans le contrôle des mouvements de la tête par rapport au corps (Preuss and Budelmann, 1995).

Cette relation entre des structures sensorielles et l'expression du gène *shh* a été rapportée chez des Vertébrés. En effet, chez le poisson-zèbre, la voie *hedgehog* est nécessaire pour un bon développement des neurones des ganglions dorsaux, des structures sensorielles indispensables à la transmission d'informations somatosensorielles (Ungos et al., 2003). Chez *Capitella* sp., un Lophotrochozoaire Annélide, une expression du gène homologue de *shh*, *CapI-hh*, a été montrée dans des cellules sensorielles au niveau de la tête chez des stades larvaires tardifs (Seaver and Kaneshige, 2006). Cette expression d'un gène *HH-like* chez *Capitella* est transitoire et réduite, tandis que chez *S. officinalis*, dont le développement est direct, *shh* s'exprime dans des structures sensorielles de façon plus

large au double plan temporel et structurel. Le lien entre les gènes *hedgehog* et les structures sensorielles semble avoir été conservé au sein des Lophotrochozoaire. Cependant, dans la lignée des Céphalopodes, *shh* a probablement été recruté pour la formation d'organes sensoriels spécifiques à ce groupe, nécessaires tout au long du cycle de vie de l'animal à l'organisation particulièrement complexe.

Pax6 est exprimé dans des structures analogues à celles des vertébrés, à savoir le système nerveux central et les yeux. Quant à *shh*, aucune expression dans le système nerveux central n'a été observée au cours du développement de *S. officinalis*. En revanche, ses expressions en limite des ganglions marqués par *Pax6* suggèrent un rôle dans la délimitation de ces territoires nerveux. Ce rôle dans la régionalisation du système nerveux pourrait être complété d'une implication dans la mise en place de la bilatéralité chez *S. officinalis*. Chez les Vertébrés, SHH est connu pour contrôler le gène *NK2.2* qui intervient dans la différenciation des neurones (Ericson et al., 1997b). Or Shigeno a montré une expression de *NK2.2* dans la masse supra-œsophagienne du cerveau d'*Octopus vulgaris* à des stades tardifs du développement (comm. pers., 2010). Ce gène n'a pas été trouvé dans la banque d'ESTs réalisée à partir d'embryons à différents stades de *S. officinalis*. Cependant, sa présence chez un autre Céphalopode suggère fortement qu'il doit bien être présent et exprimé pendant l'embryogenèse de *S. officinalis*. Il est possible que son expression soit très faible, l'ARN ne serait alors pas détectable dans la banque. Seul le gène *NK2.1* a été caractérisé. Ce gène n'intervient pas dans la formation de structures nerveuses chez les Métazoaires étudiés mais plutôt dans des structures dérivant du tube digestif (Vertébrés : Minoo et al., 1999 ; drosophile : Zaffran et al., 2000 ; *Platynereis* : Tessmar-Raible et al., 2007). Les expressions non superposables de *shh*, d'une part, et de *Pax6*, d'autre part, suggèrent que le lien d'inhibition de PAX6 via SHH est conservé chez *S. officinalis*. La caractérisation du gène *NK2.2* et la description de son pattern d'expression le long du développement de ce Céphalopode seraient nécessaires à une étude plus complète des liens entre ces gènes dans une optique comparative avec les Vertébrés, notamment, chez lesquels cette cascade est bien connue (Ericson et al., 1997b ; Jacob and Briscoe, 2003).

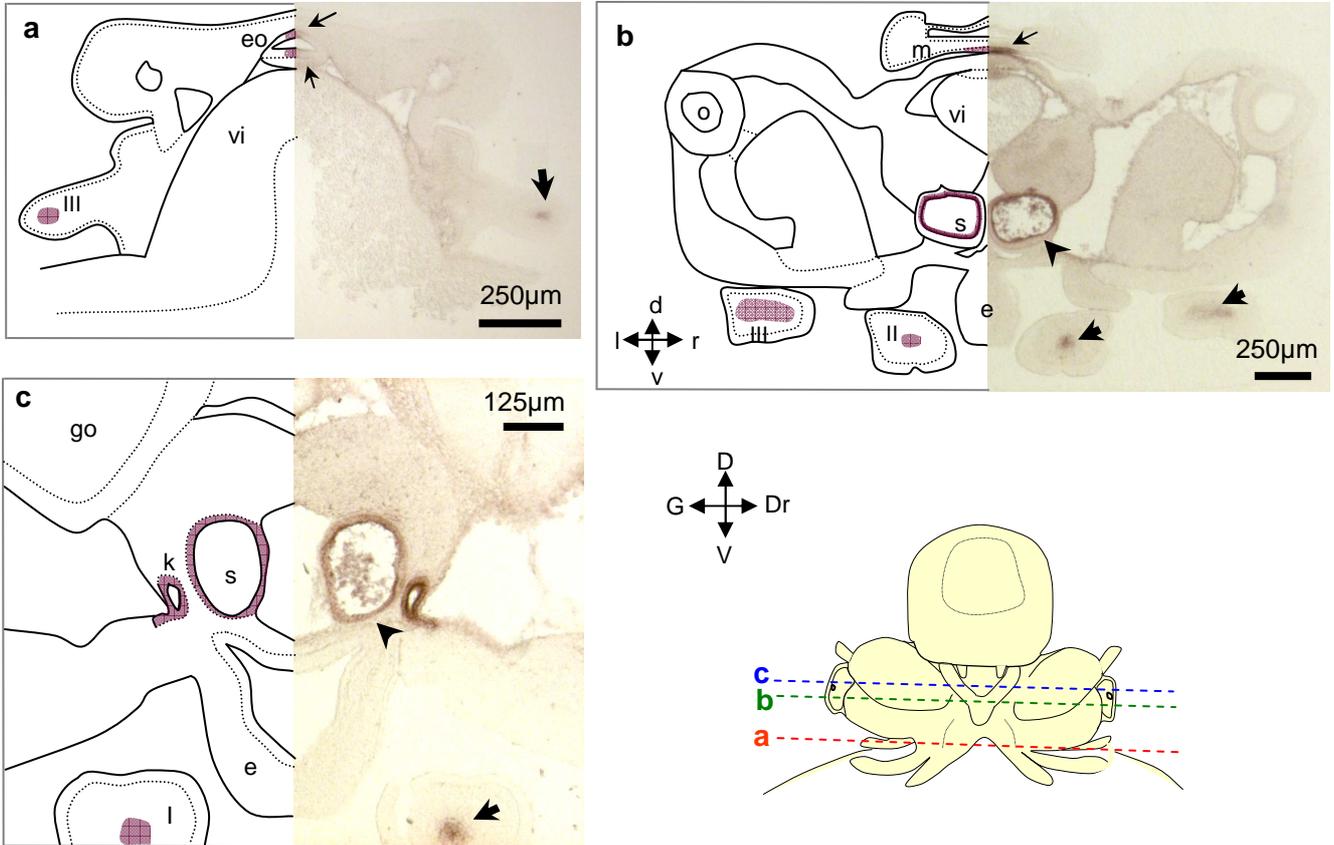


Figure 28 : Expressions de *Shh* pendant l'organogenèse de *S. officinalis*. Hybridations *in situ in toto*, suivies de sections de 20µm au cryostat d'un embryon stade 23. Les niveaux de sections sont indiqués sur le schéma en pointillés.

Légende : I, II, III, IV et V, bras ; e, entonnoir ; go, ganglion optique ; k, canal de Kölliker ; m, manteau ; o, œil ; oe, œsophage ; s, statocyste ; vi, vitellus ; D, dorsal ; Dr, droite ; G, gauche ; V, ventral..

Shh

Pax6

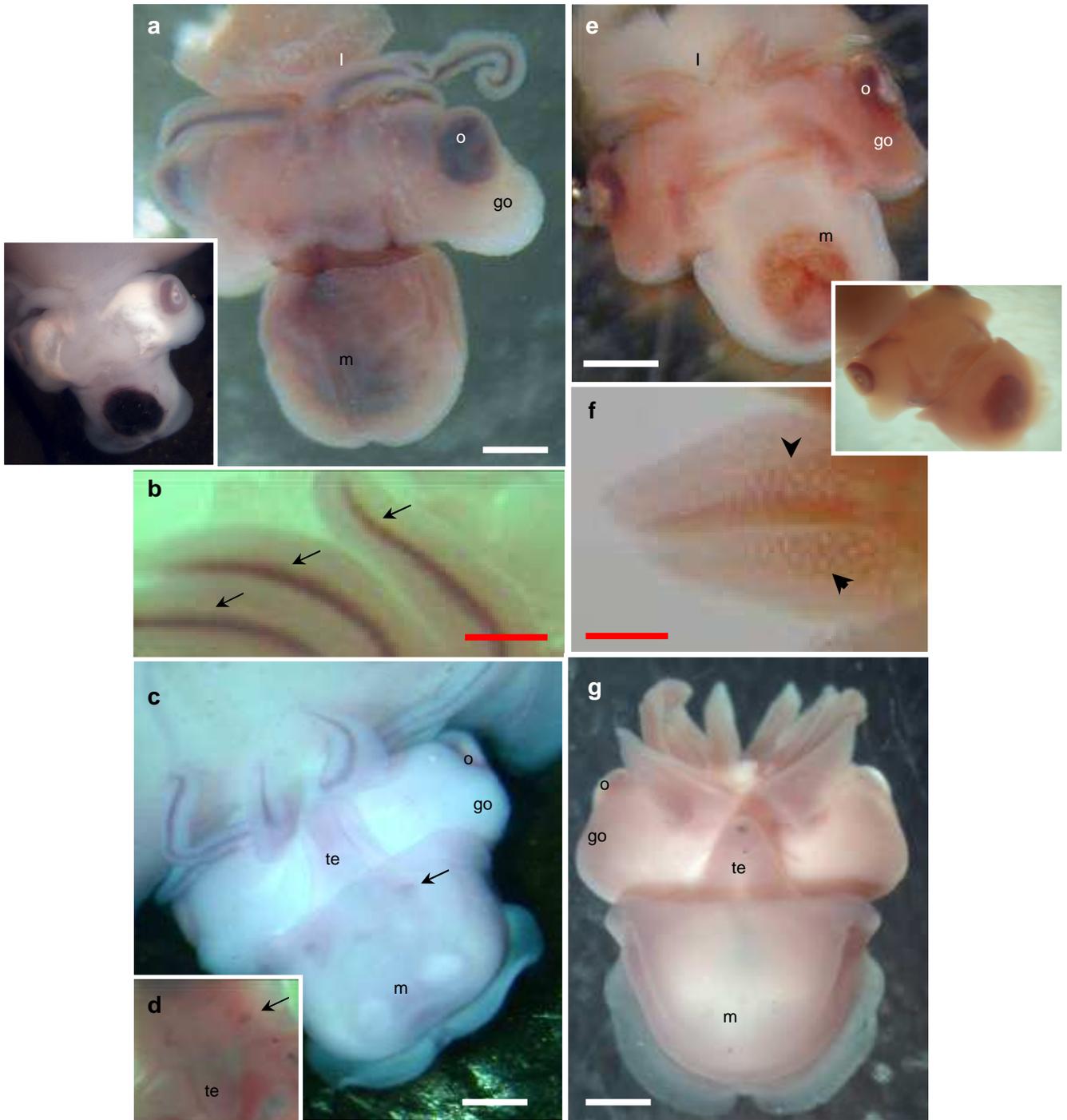


Figure 29 : Expressions de *Shh* et *Pax6* pendant l'organogénèse tardive de *S. officinalis*. Hybridations *in situ in toto*. Echelles noires 1mm, échelles rouges 100µm. **a**, **e**, stade 25 vues dorsales; **b**, focus sur la zone brachiale d'un stade 25 marqué avec la sonde *shh* ; **f**, focus sur la zone brachiale d'un stade 25 marqué avec la sonde *Pax6* ; **c**, **g**, stade 26 vues ventrales ; **d**, focus sur la zone de l'entonnoir d'un embryon stade 26 marqué avec la sonde *shh*, encarts : témoins.

Légende : I, II, III, IV et V, bras ; go, ganglion optique ; m, manteau ; o, œil ; te, tube de l'entonnoir.

2. Les plans du corps, quelle(s) implication(s) pour *Pax6* et *shh* ?

La mise en place de la régionalisation dorso-ventrale, antéro-postérieure et droite/gauche pendant le développement est une problématique particulièrement délicate chez les Céphalopodes. L'orientation des plans de leur corps se modifie au cours du développement rendant nécessaire la définition d'une orientation embryologique et d'une orientation physiologique. Lorsque l'embryon est encore sous forme de disque (stades 15 à 20), le stomodeum comprenant la bouche est dorsal, le pôle antérieur du futur adulte comprenant les bras et tentacules se situe à la périphérie du disque, alors que le pôle postérieur (manteau, branchies et entonnoir) est au centre. A partir du stade 21, l'embryon se redresse et sa conformation se rapproche de celle de l'individu adulte : la bouche et la couronne brachiale se retrouvent du côté du vitellus tandis que la masse viscérale et le manteau sont à l'opposé. La correspondance des plans antéro-postérieur et dorso-ventral n'est pas évidente dans ce contexte.

En second lieu, les Céphalopodes ne montrent pas de chaîne nerveuse ventrale ou dorsale, structure organisatrice dans de nombreux autres groupes (Coolen et al., 2009 ; Holland, 2002), ce qui interroge sur les mécanismes de régionalisation chez l'embryon de seiche. De telles particularités suggèrent que les mécanismes de mise en place pourraient être différents de ce qui est connu jusqu'à présent.

2.1. L'orientation dorso-ventrale, quels rôles pour *Pax6* et *shh* ?

Chez *S. officinalis*, l'expression de *Pax6* à des stades précoces concerne l'ensemble du SNC, incluant à la fois la future masse supra-œsophagienne et la masse sous-œsophagienne. Non seulement les territoires présomptifs des ganglions cérébroïdes sont marqués, mais il en est de même, par exemple, pour les futurs lobes palleoviscéraux.

Chez les Vertébrés, au niveau de la corde neurale, *Pax6* est exprimé uniquement au niveau dorsal du fait d'une double inhibition. Le gène est, d'une part, inhibé directement par SHH, exprimé au niveau ventral ; d'autre part, il est soumis à une inhibition intracellulaire par NK2, activé par SHH, toujours au niveau ventral. Le gène définit ainsi l'identité de motoneurones et interneurones à destinée dorsale (Ericson et al., 1997b). Par ailleurs, plus tard dans le développement, *Pax6* est nécessaire pour l'expression de gènes

qui confèrent des caractéristiques dorsales au niveau du télencéphale (Manuel and Price, 2005). Cette dichotomie dorsal/ventral est ici considérée au sein même d'une structure. Si l'on considère uniquement le cerveau de *S. officinalis*, l'expression dans la partie supra-œsophagienne du cerveau, impliquée dans l'analyse des afférences sensorielles, est congruente avec l'expression de *Pax6* dans des structures sensorielles. Mais de façon surprenante, *Pax6* est exprimé dans la partie sous-œsophagienne du cerveau, composée de centres moteurs comme les lobes palleoviscéraux et pédieux. L'expression de *Pax6* n'est donc pas restreinte dorsalement ou ventralement dans le SNC de *S. officinalis* comme cela peut être observé dans la corde neurale des Vertébrés.

A ces stades précoces, les différents territoires présomptifs des ganglions sont étendus dans le disque embryonnaire (fig. 10a). L'embryon n'a pas encore pris de volume dans le sens antéropostérieur. Si l'on considère l'orientation dite « physiologique » avec la bouche au niveau dorsal et les branchies au niveau ventral, aucune restriction de marquage dorsal ou ventral n'est notable pour *Pax6* si l'on observe les structures ganglions par ganglions. Là encore, il semblerait que *Pax6* ne soit pas préférentiellement exprimé à un niveau dorsal ou ventral.

Pendant l'embryogenèse de *S. officinalis*, *Pax6* s'exprime dans les ganglions cérébroïdes, viscéraux, mais également, dans les ganglions optiques. L'expression de *Pax6* concerne une large partie du SNC, alors que chez *Helobdella* sp. (Quigley et al., 2007), un autre Lophotrochozoaire sans métamorphose, l'expression de *HauPax6A* est restreinte à la lignée de N-téloblastes, qui donne naissance à environ 2/3 des neurones ganglionnaires. De plus, dans les deux espèces, pour lesquelles les patterns d'expression de *Pax6* sont observés à partir de stades très précoces jusqu'à la fin du développement, l'expression précède la formation des ganglions (Quigley et al., 2007). Le SNC de la sangsue *Helobdella* est composé de 34 ganglions (Blackshaw and Nicholls, 1995), alors que celui des Céphalopodes montre le plus haut degré de centralisation parmi les Mollusques, avec 37 et 38 lobes, composant les masses supra et sous-œsophagiennes du cerveau (Budelmann, 1995). Si *Pax6* n'est pas impliqué dans l'orientation dorso-ventrale, il pourrait toutefois être essentiel à la détermination et à la différenciation d'une grande partie du SNC chez *S. officinalis*.

Shh montre des expressions délimitant les côtés droit et gauche du manteau, d'abord du côté ventral, puis des côtés ventral et dorsal. L'expression dorsale au stade 16 anticipe les expressions dorso-ventrales au stade 20. Une telle expression de ce gène a également été montrée chez un embryon d'*Octopus* à un stade équivalent (Shigeno, comm. pers., 2010). Un rôle de *shh* dans le patterning dorso-ventral peut être concevable comme ce qui a déjà été montré chez les Vertébrés, chez lesquels *shh* induit des types cellulaires à destinée ventrale au niveau du tube neural de façon dépendante à la concentration en *shh* (Briscoe et al., 1999).

Chez de nombreux Protostomiens, dont la larve du Mollusque *Patella vulgata*, *hh* est exprimé le long de la ligne médiane ventrale (Nederbragt et al., 2002). Cette expression a été interprétée, suivant la théorie de l'inversion de l'axe dorso-ventral de Dohrn (1875), comme une preuve supportant l'homologie entre la corde nerveuse dorsale des Deutérostomes et la chaîne ventrale des Protostomes. Mais, contrairement à d'autres Mollusques, les Céphalopodes n'ont pas de cordon neural. D'autres Protostomes ne montrent pas d'expression de *hh* en relation avec la chaîne nerveuse ventrale. En effet, chez la sangsue *Helobdella robusta*, *Hro-hh* est exprimé dans l'épiderme de la plaque germinale, mais sans relation avec la chaîne nerveuse en développement (Kang et al., 2003) et chez *Euscorpius flavicaudis* (chelicerate), *hh* est exprimé en bandes ventrales continues, excluant la chaîne nerveuse ventrale (Simonnet et al., 2004). Ainsi, l'expression de *shh* dans les zones centrales des organismes (en tout cas, des Protostomes) ne semble pas liée à la présence d'une corde nerveuse, mais correspond plus certainement à une délimitation bilatérale du système nerveux.

L'étude de la symétrie droite/gauche chez plusieurs organismes modèles ouvre des perspectives évolutives. Elle pourrait aussi révéler des mécanismes nouveaux d'établissement des plans du corps. Comme la détermination de la symétrie droite/gauche a pour contexte la mise en place des régions antéropostérieure et dorso-ventrale, l'étude de la mise en place de la symétrie droite/gauche peut nous donner des indices sur la manière dont les axes antéropostérieur, dorso-ventral et droite/gauche interagissent pour faire parvenir aux cellules des informations de position exactes lors du développement. Ces données sont cruciales dans le contexte des études sur l'origine de la bilatéralité, synapomorphie des Bilatériens. Les études portant sur la symétrie droite/gauche chez les Protostomiens étaient, jusqu'ici, limitées aux Gastropode Lymnée et Nématode *C. elegans*.

2.2. *Shh* semble être impliqué dans la mise en place de la bilatéralité chez *S. officinalis*

2.2.1. *Shh* s'exprime le long de l'axe de symétrie bilatérale pendant le développement de *S. officinalis*

Shh s'exprime le long de l'axe de symétrie droite/gauche au niveau du manteau des embryons aux stades précoces, 16 à 20, (fig. 25d et 25g). Cela suggère un lien entre ce gène et l'établissement de la bilatéralité chez *S. officinalis*. En fait, SHH a déjà montré un rôle direct dans l'attraction d'axones à la ligne médiane ventrale du tube neural de la souris (Charron et al., 2003) ou dans celle d'axones de neurones dopaminergiques dans le cerveau moyen (Hammond et al., 2009). *Shh* pourrait donc intervenir dans la différenciation neuronale proche ou dans la délimitation de la croissance axonale chez les Céphalopodes. Pourtant, chez le poisson-zèbre, le signal *hh* ne semble pas guider directement les axones rétinaux et commissuraux dans le cerveau antérieur (Ertzer et al., 2007). Les signaux *hh* semblent affecter le guidage axonal de façon indirecte, via son rôle dans l'organisation de la ligne médiane (Dale et al., 1997 ; Karlstrom et al., 2003 ; Mason and Sretavan, 1997). Le gradient de SHH pourrait conditionner l'arrêt de la croissance axonale et spécifier l'identité cellulaire. Chez *S. officinalis*, un immunomarquage à la tyrosine hydroxylase, enzyme intervenant dans la voie de synthèse de la dopamine, révèle la présence de neurones sensoriels primaires au même niveau sur le manteau que les marquages *shh* au même stade (Baratte and Bonnaud, 2009). Il n'y a aucun croisement d'axones au niveau de la ligne de symétrie droite/gauche. *Shh* pourrait, par conséquent, avoir un rôle dans la mise en place de cette symétrie en agissant comme molécule répulsive des axones en croissance des motoneurones et, donc, permettre la mise en place de la bilatéralité chez *S. officinalis*. Ceci, vraisemblablement, en association avec d'autres molécules de guidage de la croissance axonale appartenant, par exemple, à la famille des *netrin* ou *robo*. Un même marquage suivant l'axe de symétrie droite/gauche au niveau du manteau a été montré au cours de l'embryogenèse d'*Octopus vulgaris* (Shigeno, comm. pers., 2010), ce qui conforte l'hypothèse d'un rôle dans la mise en place de la bilatéralité pour SHH chez les Céphalopodes de façon générale.

Les gènes *shh* et *Pax2/5/8* montrent des expressions dans le système nerveux central et des rôles dans sa formation et sa mise en place chez toutes les espèces étudiées, Vertébrés (*shh* : Briscoe et al., 2001 ; *Pax2/5/8* : McCauley and Bronner-Fraser, 2002), Ecdysozoaires (*shh* : Park et al., 2003 ; *Pax2/5/8* : Czerny et al., 1997) et Lophotrochozoaires (*shh* : Kang et al., 2003 ; *Pax2/5/8* : O'Brien and Degnan, 2003). Chez *S. officinalis*, *Pax2/5/8* montre des expressions très restreintes et transitoires au niveau des ganglions pédieux dans les stades précoces, puis dans les tractus optiques au stade 22. Les expressions de *Pax2/5/8* se cantonnent principalement à des structures musculaires. Si SHH semble avoir des liens avec le système nerveux, notamment en collaboration avec PAX6 dans la délimitation des ganglions, il ne présente aucune expression au sein même des ganglions, aux stades où ces derniers sont déjà visibles en tant que structures ganglionnaires, c'est-à-dire à partir du stade 20 en coupe. La mise en place du SNC répondrait donc à d'autres gènes, d'autres voies moléculaires chez *S. officinalis*. Ainsi, l'émergence de cette structure convergente n'aurait pas forcément nécessité la même « trousse à outils génique » que le cerveau des Vertébrés.

Si les patterns d'expression des gènes nous permettent d'émettre des hypothèses quant à leurs rôles possibles, la mise en œuvre d'approches fonctionnelles reste indispensable pour une meilleure compréhension de leurs fonctions.

2.2.2. L'inactivation de la voie *shh* entraîne malformations et asymétries

La voie de signalisation SHH a été inactivée avec de la cyclopropamine, un inhibiteur connu de cette voie chez les Vertébrés (Cooper et al., 1998 ; Incardona et al., 1998, 2000) et les Lophotrochozoaires (Kang et al., 2003). La cible de la cyclopropamine est la protéine Smoothened (Smo) (Chen et al., 2002). Cette protéine possède 7 domaines transmembranaires ; elle est reliée aux récepteurs couplés à la protéine. Dans les cellules non exposées au morphogène SHH, l'activité de Smo est inhibée par la protéine Patched (Ptc) qui est aussi le récepteur de Shh. Lorsque SHH se fixe à Ptc, l'inhibition sur Smo est levée et Smo peut stimuler des facteurs de transcription, Gli chez les Vertébrés et Ci chez la drosophile. Ces facteurs de transcription induisent ensuite l'expression des gènes cible de HH (fig. 30).

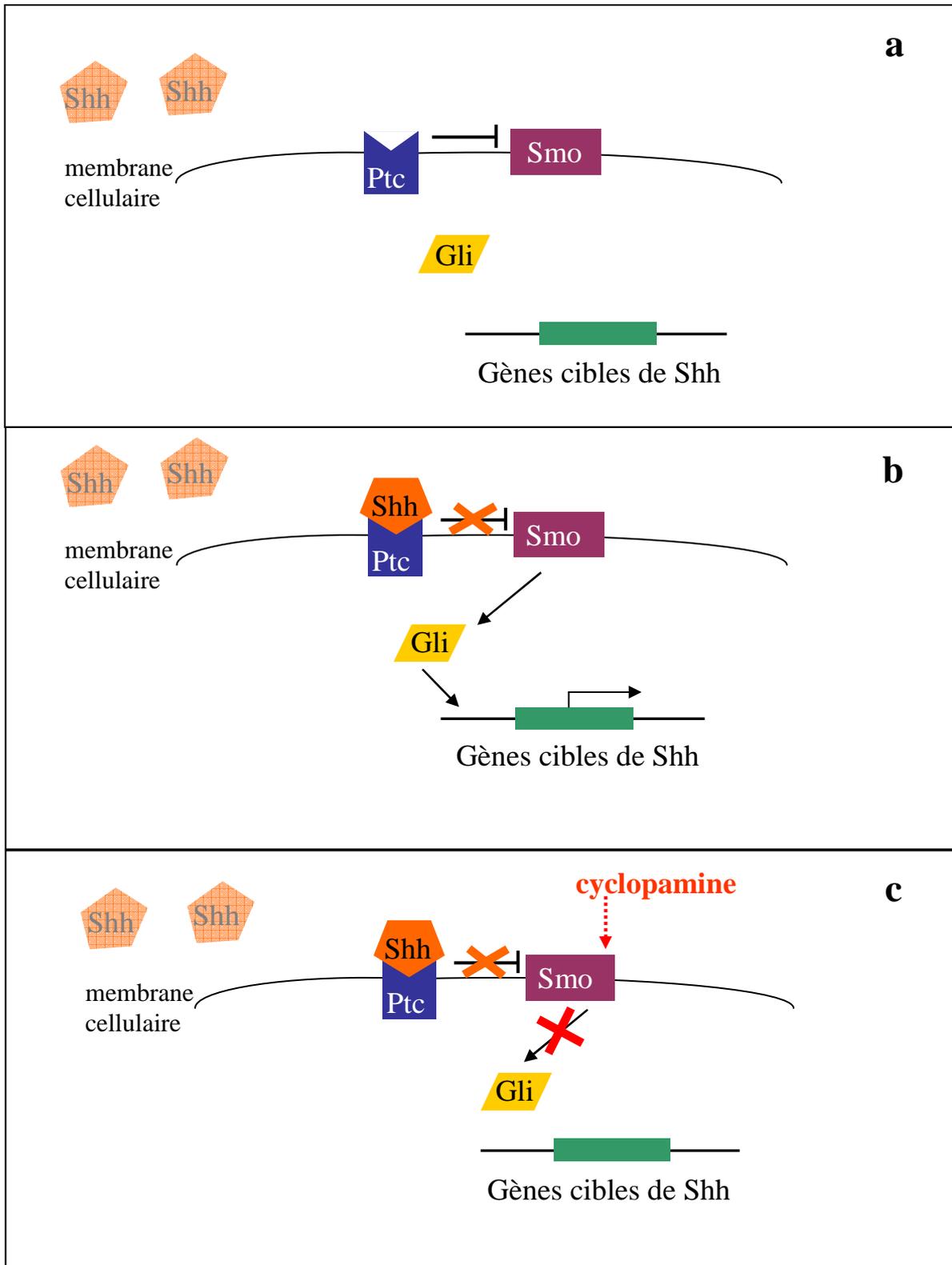


Figure 30 : Mode d'action de la cyclopamine sur la voie SHH. Smo, smoothened ; Ptc, Patched

Des embryons ont été traités au SB431542 à une concentration de 10 μ M en fin de segmentation, au stade 9 où on observe un amas de cellules au pôle animal, tandis que l'épibolie continue vers le pôle végétatif. Parmi ceux ayant poursuivi leur développement (environ 33%), 58% présentent des retards de développement sur un côté droit ou gauche du disque embryonnaire (fig. 31a et 31b). Alors que l'œil et la couronne brachiale sont bien visibles d'un côté, ils le sont nettement moins de l'autre. Le manteau, par contre, est visible dans son intégralité, sans différence par rapport à l'axe de symétrie bilatérale.

Les traitements à la cyclopropamine à partir du stade 16 (alors que l'embryon est sous forme de disque), en début d'organogenèse, jusqu'au stade 24, ont eu pour conséquence un grand nombre de malformations chez les embryons au niveau de la région tête/pied (formée par les bras, les tubes de l'entonnoir et les lobes optiques) et du manteau. Les embryons arrêtés à des stades 20 et 21 ont montré, pour 61% d'entre eux, des déformations telles que des hypertrophies dans la région optique et des dispositions asymétriques des bras (fig. 32b). Un deuxième type de phénotype est également observé aux stades 20 et 21 chez 22% des embryons traités en début d'organogenèse et ayant poursuivi leur développement. Il s'agit de phénotypes de type « boule » avec des bourgeons de bras en forme de boule, qui présentent un retard dans le développement en longueur (fig. 32a). On a pu observer avec les HIS que *shh* s'exprimait dans les bourgeons de bras, puis dans les cordes nerveuses brachiales. Ce retard de développement des bras, et notamment en longueur, serait donc cohérent avec un rôle de ce gène dans la formation et l'orientation de ces structures. Les embryons arrêtés à des stades plus tardifs (23 et 24) ont montré des bras plus courts que les témoins et disposés de façon asymétrique ainsi que des manteaux plus courts, découvrant les branchies, pour 80% des embryons, notamment, au niveau ventral (fig. 33). Ces mêmes déformations se retrouvent chez les embryons dont le traitement a commencé plus tardivement, à des stades 22/23 (fig. 34), ce qui suggère une large fenêtre d'action au cours du développement pour le gène *shh*.

Ces résultats confortent l'hypothèse d'un rôle de SHH dans la mise en place de la bilatéralité ; hypothèse déjà proposée au vu des expressions du gène. Ce rôle serait très précoce, au moins dès le début de l'organogenèse. Il a été montré que des souris invalidées pour *shh* manifestaient de multiples défauts de latéralité très tôt également, dès 8 jours post-fécondation (Tsukui et al., 1999).

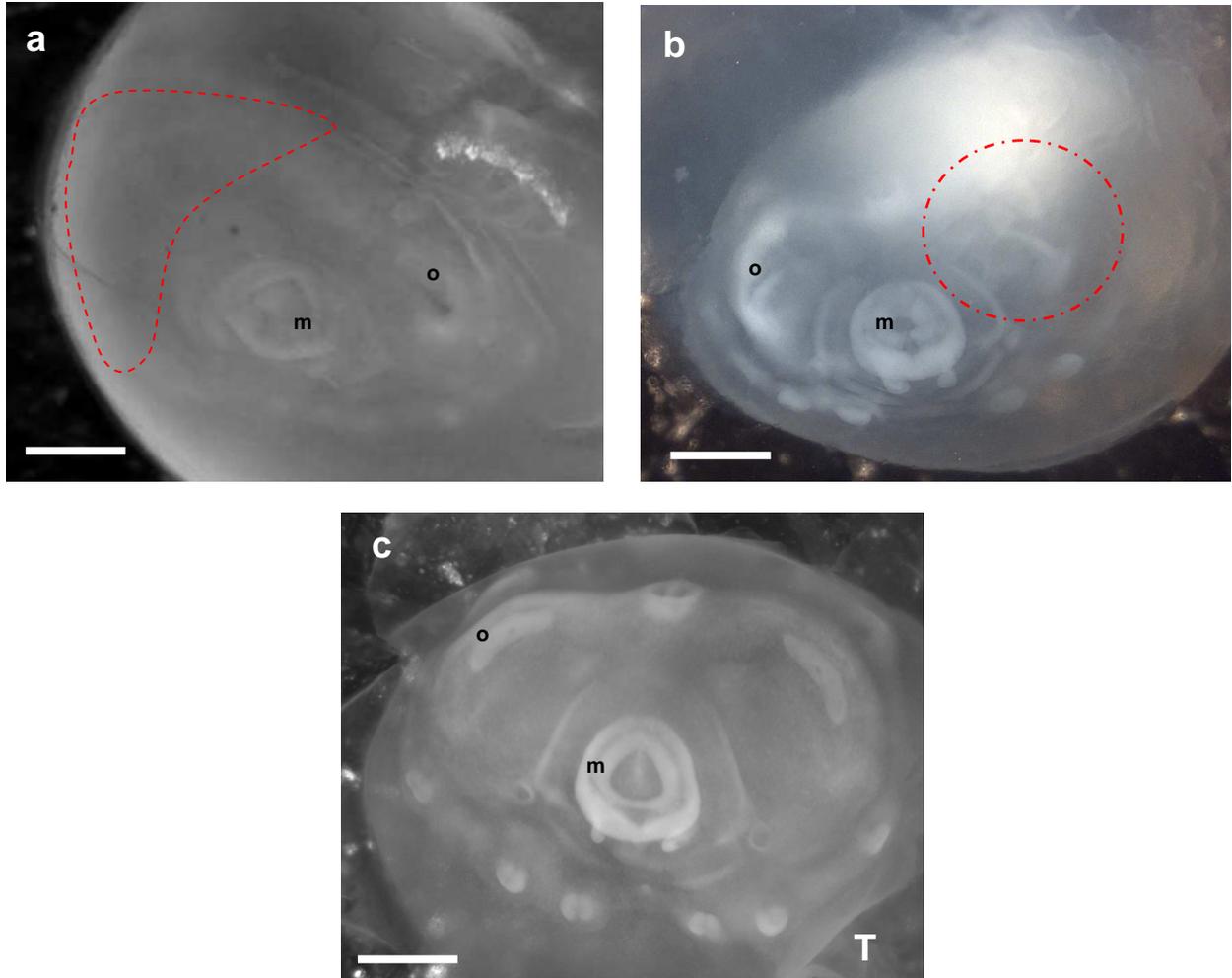


Figure 31 : Embryons traités à la cyclopamine, traitement démarré stade 9, photos sur animaux vivants stade 17. T, témoin, échelle 100 μ m. **a**, **b**, embryons traités présentant des retards unilatéraux de développement (pointillés rouges) ; **c**, témoin. m, manteau ; o, œil.

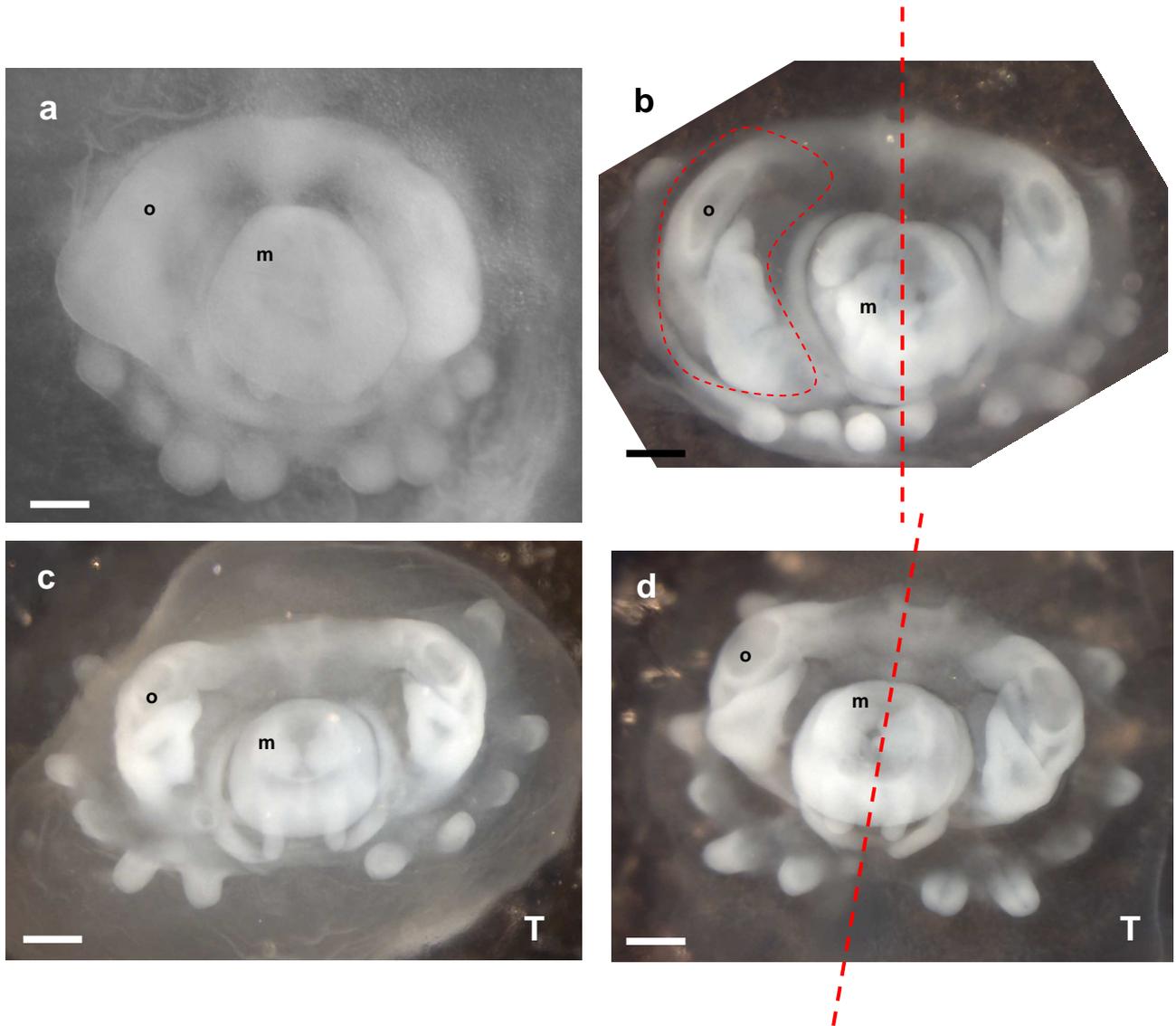


Figure 32 : Embryons traités à la cyclopamine, traitement démarré stade 15, photos sur animaux vivants stade 20. T, témoin, échelle 250 μ m. **a**, embryon traité présentant un phénotype « boule » ; **b**, embryons traité présentant des asymétries (pointillés rouges) ; **c**, **d**, témoins. m, manteau ; o, œil.

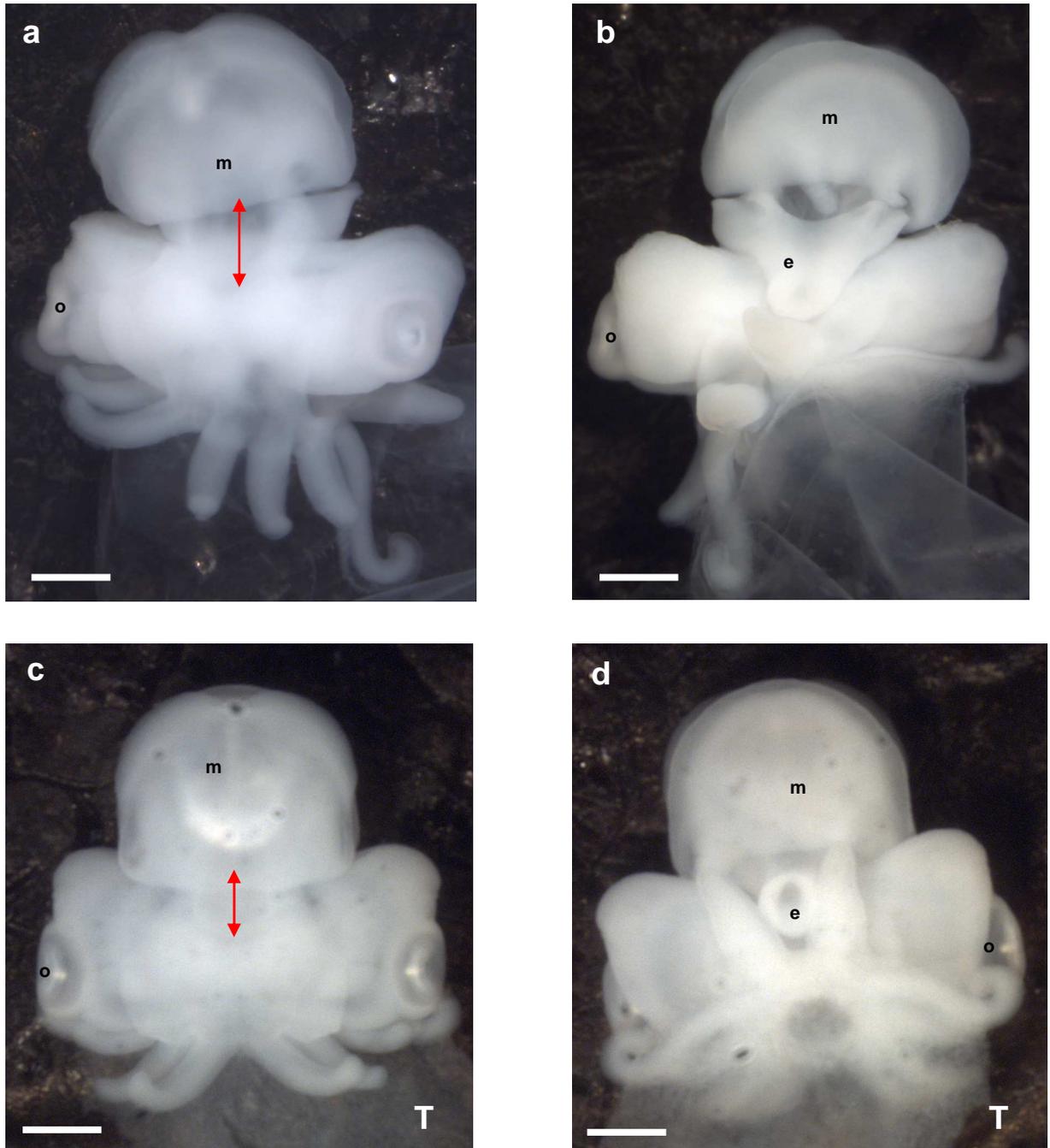


Figure 33 : Embryons traités à la cycloamine, traitement démarré stade 15, photos sur animaux vivants stade 23. T, témoin, échelle 1mm. **a**, embryon traité vue dorsale, le manteau est plus court que chez le témoin (double flèches rouges) ; **b**, embryon traité vue ventrale ; **c**, témoin vue dorsale ; **d**, témoin vue ventrale. e, entonnoir ; m, manteau ; o, œil.

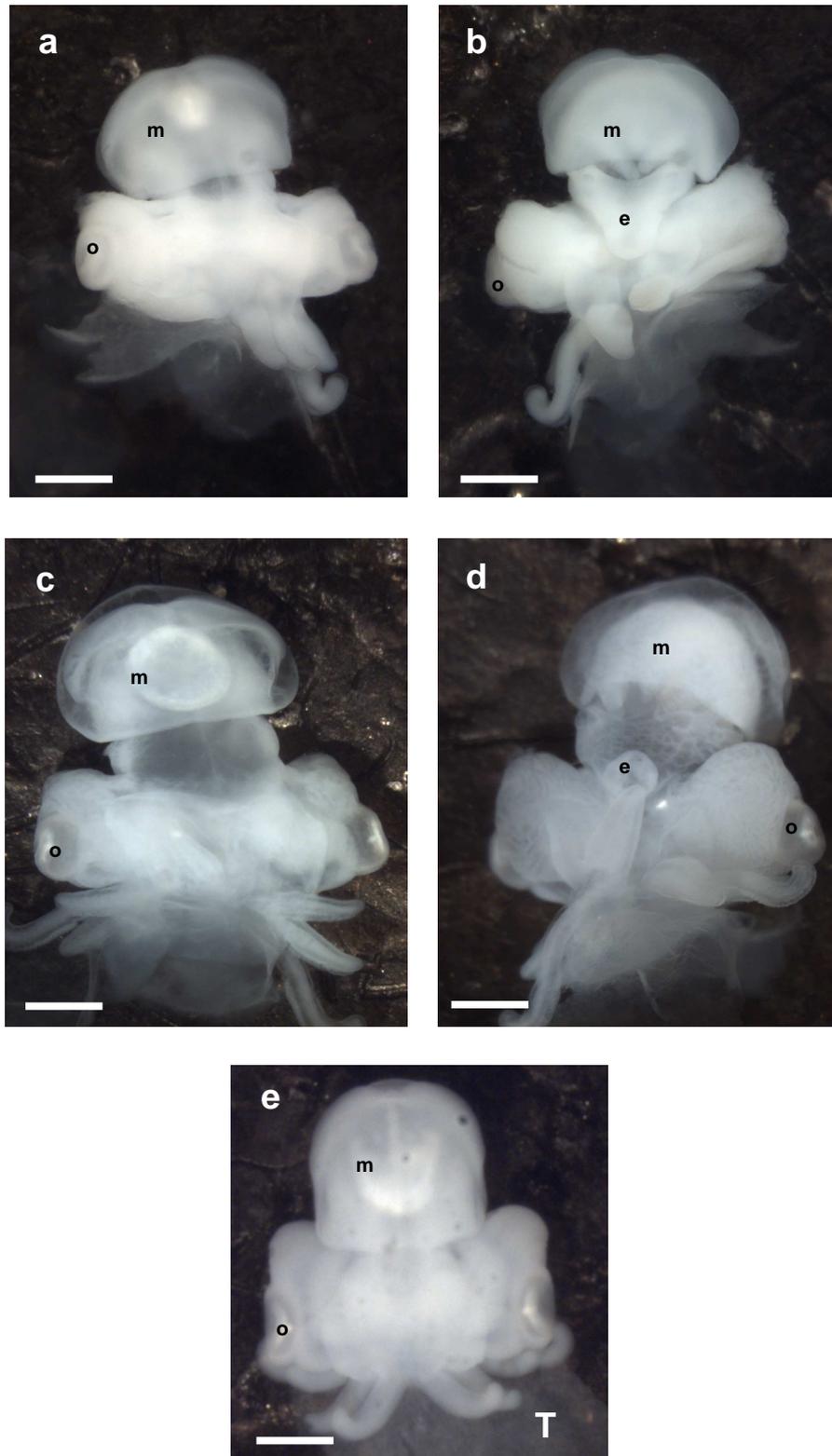


Figure 34 : Embryons traités à la cyclopamine, traitement démarré stade 22, photos sur animaux vivants stade 23+. T, témoin, échelle : 1mm. a, c, embryons traités vues dorsales ; b, d, embryons traités vues ventrales ; e, témoin vue dorsale. e, entonnoir ; m, manteau ; o, œil.

Chez l'embryon de poulet, une substance proche de l'activine (famille des TGF β) sécrétée uniquement dans la partie droite de la ligne primitive supprime l'expression de *shh* de ce côté. L'expression restante de *shh*, du côté gauche s'est révélée capable d'induire l'expression de *Nodal* (Levin et al., 1997). Chez la souris, *Nodal* est notamment impliqué dans l'organisation de l'axe de symétrie droite/gauche pendant le développement embryonnaire précoce. Nous avons donc tenté d'inactiver *Nodal* pendant le développement de *S. officinalis* pour en déduire les rôles et les éventuelles interactions avec SHH.

2.3. Nodal, un autre facteur clé pendant l'embryogenèse de *S. officinalis*

Nodal a été inactivé par l'application de SB431542. Le SB431542 (4-(5-benzo[1,3]dioxol-5-yl-4-pyridin-2-yl-1*H*-imidazol-2-yl)-benzamide) a pour cible les récepteurs « kinase-like » de type I, ALK5, ALK4, récepteurs de l'activine et le récepteur de *Nodal*, ALK7. Le SB431542 interfère avec la fixation de *Nodal* sur son récepteur. Il n'a aucun effet sur les récepteurs de la famille ALK qui reconnaissent les BMPs (Bone Morphogenetic Protéins). De ce fait, le SB431542 est un inhibiteur sélectif de l'activine endogène et de *Nodal* (Inman et al., 2002). Chez les Vertébrés, ce sont principalement les gonades qui sécrètent l'activine. Or, les gonades de *S. officinalis* restent indifférenciées jusqu'à la fin du développement embryonnaire. La distinction histologique des ovaires et testis n'est possible qu'au moment de l'éclosion (Mangold –Wirz, 1963). De plus, aucune trace de l'activine n'a été trouvée dans la banque d'ESTs réalisée à partir d'embryons de *S. officinalis*. Cependant, il n'est pas impossible que les ARNm correspondants à l'activine soient présents en trop petite quantité pour être détectés. On ne peut donc pas exclure que le SB431542 appliqué durant le développement d'embryons de seiche ait pu toucher également la voie de l'activine.

L'interaction entre *Nodal* et son récepteur ALK7 conduit à la libération intracellulaire de Smad2 qui va interagir avec Smad4 et être transloqué au noyau. Le complexe Smad2-Smad4 interagit avec les protéines Fast-1 ou Mix/Bix, ce qui va avoir pour conséquence la transcription de gènes cibles de *Nodal* tel que *Lefty* (Stemple, 2000).

Chez les Vertébrés, avant le début de l'organogenèse, *Nodal* est exprimé au niveau du nœud embryonnaire (centre organisateur localisé à l'extrémité apicale de la ligne

primitive et responsable de l'organisation du tronc) suivant un courant orienté de la droite vers le mésoderme de la lame latérale gauche. Nodal y active plusieurs gènes comme *Pitx* dont les produits permettent la traduction du signal asymétrique en différences morphologiques pendant l'organogenèse (pour revue : Hamada et al., 2002). Le rôle de Nodal est donc très précoce dans le développement. Le traitement au SB431542 se devait d'être également le plus précocement possible dans le développement de *S. officinalis*. Les embryons traités de la façon la plus précoce l'ont été en fin de segmentation, au stade 9, à une concentration de 10 μ M. Les embryons de *S. officinalis* traités au SB431542 à partir de la fin de segmentation (stade 9, 31 embryons traités) sont tous morts sans avoir avancé dans le développement. Une inhibition de Nodal avant le début de la gastrulation serait donc létale chez *S. officinalis*. Des embryons du Gastropode *Biomphalaria glabrata* traités au SB431542 à une concentration de 10 μ M à des stades très précoces du développement (1-16 cellules) ont donné des embryons dont la gastrulation n'était pas complète et ont résulté en des juvéniles sans coquille. En ce qui concerne *S. officinalis*, Nodal paraît indispensable à la mise en place de la gastrulation comme pour le Gastropode *B. glabrata*.

Des souris invalidées pour Nodal meurent très vite, mais seulement après la gastrulation (Reissmann et al., 2001). Cela suggère que, chez les Vertébrés, la gastrulation ne dépendrait pas uniquement de Nodal. Cependant, bien que le « knock out » soit plus spécifique, Sun et al. (2006) ont montré qu'une balnéation en présence de SB431542 provoquait un développement anormal chez l'embryon de *Danio rerio*, ceci de façon dépendante à la concentration de l'inhibiteur. Les embryons étaient traités au stade « une cellule » et montraient « seulement » des malformations au niveau des yeux après avoir séjourné dans une solution contenant du SB431542 à une concentration de 20 μ M. L'impact sur le développement précoce était donc moins définitif à une concentration pourtant supérieure à celle utilisée pour les traitements des Mollusques *B. glabrata* et *S. officinalis*. Cela montre que, si chez les Vertébrés Nodal ne joue pas un rôle prépondérant dans le déclenchement de la gastrulation, chez les Mollusques, il est déterminant à son démarrage.

Parmi les 52% d'embryons de *S. officinalis* traités en début d'organogenèse (stade 15) ayant survécu, 32% montrent un retard de développement d'un côté gauche ou droit par rapport à l'axe de symétrie bilatéral (fig. 35a). Par la suite, en avançant dans le développement, les sacs coquilliers restent ouverts jusqu'à des stades 22/23 (fig. 35c), tandis que chez les témoins, les sacs se sont fermés dès le stade 20. Les embryons montrent

des phénotypes de type « boule » avec des bourgeons de bras en forme de boule, qui présentent un retard dans le développement vers l'avant (fig. 35b et 35d). Parmi les embryons ayant avancé, on constate chez une grande majorité (76%) que le manteau est plus court que chez les témoins, et semble « gonfler » (fig. 36, flèches rouges). La sécrétion de la coquille est très retardée. Chez le gastropode *B. glabrata*, certains embryons dont la gastrulation était achevée, montraient des coquilles non enroulées. Ce phénotype dit de « coquille droite » était observé chez 43% des animaux à gastrulation complète traités à une concentration de 10 μ M (Grande and Patel, 2009). Alors que chez le Gastropode, Nodal semble nécessaire seulement à l'enroulement de la coquille et à sa conformation chirale, chez la seiche, Nodal semble être impliqué dans la formation du sac coquillier et dans la formation de la coquille elle-même. L'internalisation de la coquille chez les Coléoides a pu se faire en parallèle d'un switch de l'action de Nodal dans cette même structure. Une modification de forme de la coquille a eu lieu concomitamment à son internalisation. La coquille interne de *S. officinalis* n'est pas enroulée mais droite. L'action de Nodal a pu basculer d'un contrôle de forme, comme chez les Gastropodes, au contrôle de la formation de la structure elle-même chez les Coléoides. Ce facteur pourrait avoir contribué à la régression de la coquille et, de ce fait, au développement des structures musculaires locomotrices comme le manteau.

Les embryons traités après le stade 22 ne montrent pas d'anomalies morphologiques. Tous les embryons traités avant organogenèse sont morts sans avoir progressé dans le développement. Les embryons traités en début d'organogenèse présentent de sévères malformations. Nodal interviendrait donc en tout début de développement de *S. officinalis*, avec un rôle décisif pour le démarrage de l'organogenèse. Son implication pourrait s'étendre jusqu'aux stades 21/22 à partir desquels l'inhibition du gène ne provoque plus de malformations.

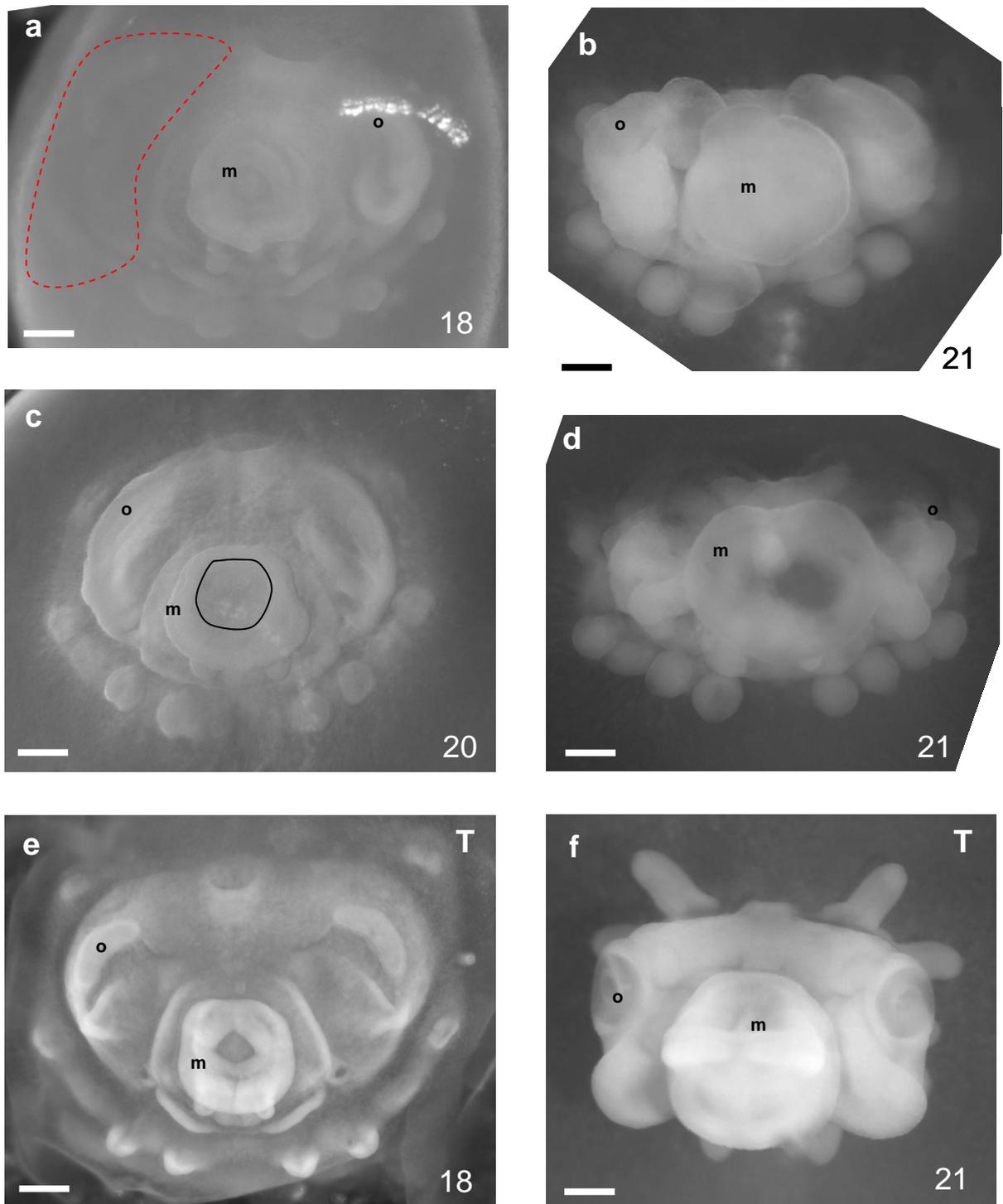


Figure 35 : Embryons traités au SB431542, traitement démarré stade 15, photos sur animaux vivants. Les stades sont indiqués en bas à droite sur les photos. T, témoin, échelle : 250 μ m. **a**, embryon traité présentant un retard de développement (pointillés rouges) ; **b**, **c**, embryons traités présentant un phénotype « boule » ; **c**, embryon traité présentant un sac coquillier ouvert (cercle noir) ; **e**, témoin stade 18 ; **f**, témoin stade 21. m, manteau ; o, œil.

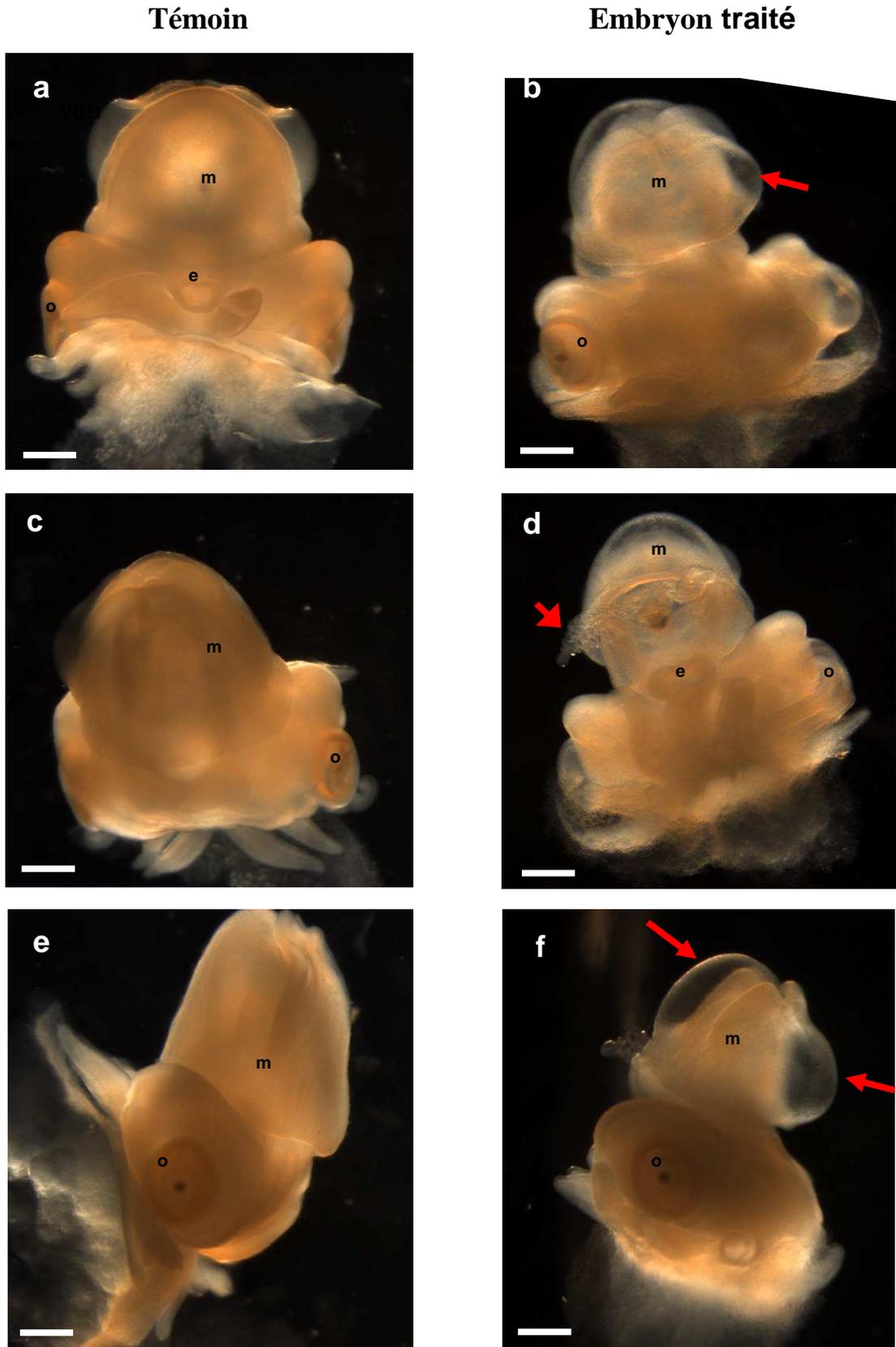
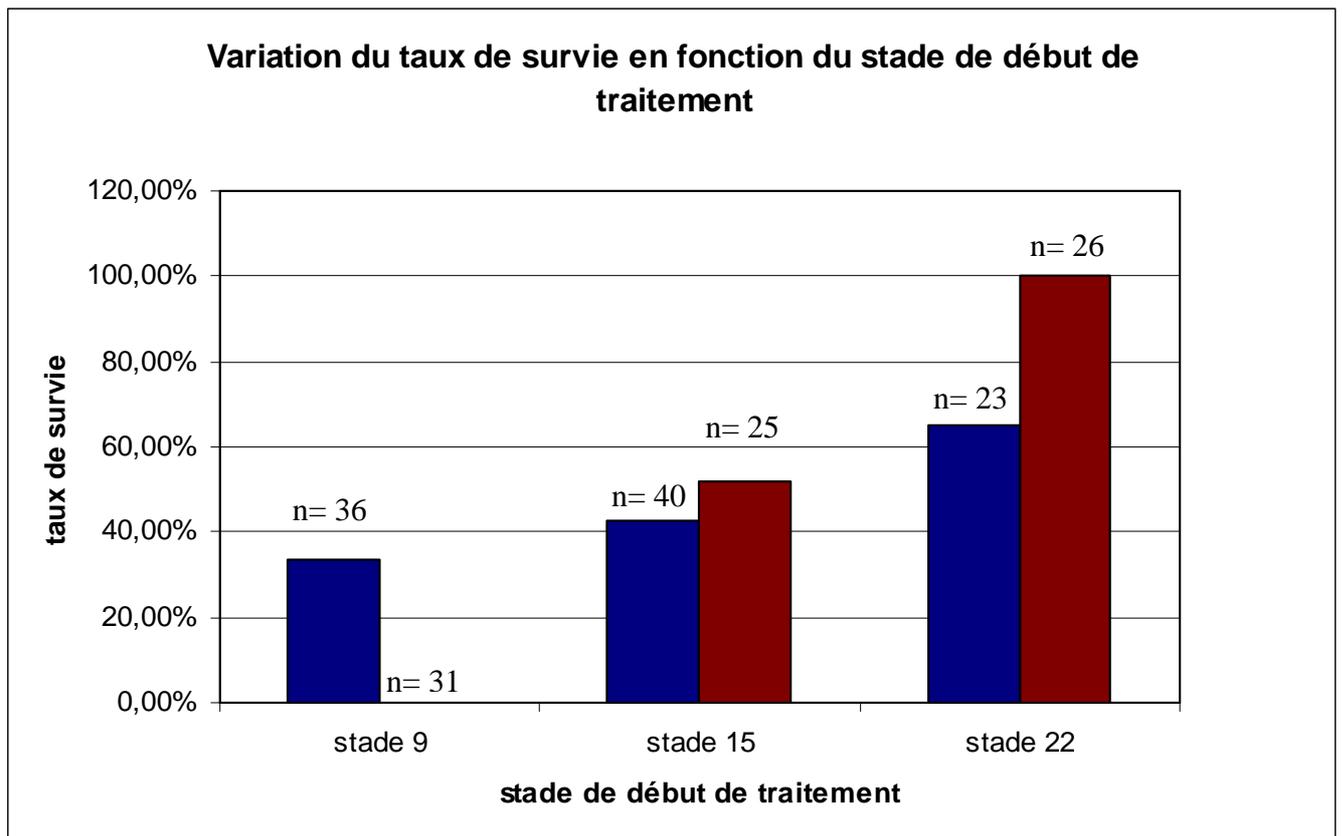


Figure 36 : Embryons traités au SB431542, traitement démarré stade 15, fixées au stade 24. Echelle 1mm. **a**, témoin vue ventrale ; **b**, embryon traité vue dorsale ; **c**, témoin vue postérieure ; **d**, embryon traité vue ventrale ; **e**, témoin vue latérale ; **f**, embryon traité vue latérale. Les flèches rouges indiquent les gonflements du manteau. e, entonnoir ; m, manteau ; o, œil.

De façon générale, le taux de mortalité augmente avec la précocité du traitement pendant le développement de *S. officinalis* (fig. 37). Plus le traitement est tardif, plus le taux de survie est important. Les deux gènes étudiés auraient donc des fonctions déterminantes dans les stades précoces de l'embryogenèse pour la spécification et la détermination des territoires. La variation du taux de survie est progressive chez les embryons traités à la cyclopamine, Il passe de 33% pour les traitements avant organogenèse à 42% pour les traitements début organogenèse. Il augmente nettement (65%) chez les embryons traités plus tardivement, au stade 22. Par contre, en ce qui concerne les embryons qui se sont développés en présence de SB431542, la variation du taux de survie est beaucoup plus tranchée puisqu'elle passe de 0% avant organogenèse à 100% chez les stades tardifs, en passant par environ 50% pour les embryons traités stade 15 (fig. 37). Ces résultats laissent penser que la fenêtre d'action de SHH serait beaucoup plus large que celle de Nodal. D'après ces résultats, Nodal serait indispensable au démarrage de l'organogenèse mais pas à l'embryogenèse tardive, après le stade 22.



■ **cycloamine**

■ **SB431542**

Figure 37 : Graphique représentant la variation du taux de survie en fonction du traitement et du stade de début de traitement. n, le nombres d'individus total par lot (un lot : un pool d'animaux traité au stade x).

Chez l'embryon de poulet, il a été montré qu'une substance proche de l'activine (famille des TGF β) sécrétée uniquement dans la partie droite de la ligne primitive supprime l'expression de *shh* de ce côté. L'expression restante de *shh*, du côté gauche s'est révélée capable d'induire l'expression de Nodal (Levin et al., 1997). Chez les mammifères, *shh* n'a jamais montré d'expressions asymétriques. Les souris mutantes pour *shh* présentent des défauts de latéralité comme des poumons gauche des deux côtés ou l'absence d'expression de *Lefty* (Tsukui et al., 1999). Chez *S. officinalis*, le pattern d'expression de Nodal est encore inconnu. Les résultats des balnéations montrent, cependant, que son rôle serait très précoce, avant organogenèse. En ce qui concerne le gène *shh*, une expression très précoce a été observée, dès le premier stade étudié, le stade 15. Ces résultats ne permettent pas d'établir de chronologie entre l'expression de ces deux gènes. Des HIS avant organogenèse seraient nécessaires pour répondre à cette question. Par ailleurs, si l'expression de *shh* ne semble pas indispensable au démarrage de l'organogenèse, celle de *Nodal* paraît cruciale. Si l'expression de *Nodal* dépendait de celle de *shh* en amont, l'inactivation de *shh* serait, elle aussi, décisive pour la phase de gastrulation, ce qui n'est pas le cas chez *S. officinalis*. Une interaction entre ces deux gènes n'est donc pas évidente ici. Néanmoins, la présence de phénotypes similaires pour les embryons traités au SB421543 d'un côté, et à la cyclopamine de l'autre, au stade 15 suggère des fonctions en relation pour Nodal et SHH et, éventuellement, un lien moléculaire. En effet, les deux traitements ont provoqué des retards de développement d'un côté de l'embryon aux stades précoces, puis des phénotypes « boules » aux stades suivants. Les deux gènes interviendraient donc dans la mise en place de la bilatéralité. Quant au lien précis entre les deux voies, il reste à éclaircir.

Chez les Vertébrés, SHH agit par diffusion de la partie ventrale de la corde neurale vers les côtés gauche et droit et contrôle ainsi la différenciation neuronale de part et d'autre de l'axe de symétrie bilatérale (Ericson et al., 1997b). Cette fonction dans la mise en place de la bilatéralité semble avoir été conservée chez les Céphalopodes en dépit de l'absence de chaîne nerveuse centrale. D'après les résultats d'HIS et d'inactivation de cette voie par balnéation, il semblerait que la zone originelle de diffusion du morphogène soit au niveau du manteau, le long de l'axe de symétrie droite/gauche. Le morphogène pourrait intervenir en agissant comme molécule répulsive des axones en croissance. L'inactivation de la voie *shh* entraînerait alors des déformations asymétriques majeures.

Le système nerveux des Céphalopodes est, parmi les Mollusque et, plus largement, les Lophotrochozoaires, exceptionnellement complexe. Il se constitue d'une part, de structures fortement convergentes avec les Vertébrés comme leur système nerveux central, et il présente d'autre part, des différences de taille comme l'absence de cordon nerveux central. Le développement du SNC des Céphalopodes aurait été rendu possible par l'implication de gènes, tel que *Pax6*, gène intervenant aussi dans la formation du cerveau des Vertébrés, ce qui suggère que la formation de structures analogues nécessite l'action des mêmes gènes. Cela avait été largement montré pour les structures photosensorielles et nous montrons ici que ce serait également le cas pour un organe aussi complexe que le cerveau.

On constate, de même, que certains gènes connus pour intervenir dans la mise en place du système nerveux central, comme *shh* ou *Pax2/5/8*, chez d'autres espèces, ne sont pas ou peu impliqués chez *S. officinalis*. L'apparition du cerveau aurait aussi nécessité l'intervention d'autres gènes, qui demandent encore à être caractérisés. D'après les expériences de balnéations en présence d'inhibiteurs, la mise en place de la symétrie droite/gauche chez les Céphalopodes requiert probablement les mêmes gènes, homologues chez les Vertébrés, tels que *shh* et *Nodal*. Cependant, l'absence de chaîne nerveuse centrale chez les Céphalopodes nous amène à penser que la zone origine de cette mise en place est différente chez les Céphalopodes. Cette zone pourrait bien correspondre à l'axe de symétrie bilatérale au niveau du manteau, comme suggéré par l'expression de *shh* à ce niveau. Le contrôle nerveux du manteau musculueux doit se faire simultanément des côtés gauche et droit pour permettre la propulsion et donc une fuite rapide. Le système nerveux était probablement mis en place en grande partie avant l'émergence et le développement des structures modifiées et dérivées permettant la locomotion. Son niveau de complexité chez les Céphalopodes a sans doute été un élément de première importance qui a permis l'apparition de ces innovations morphologiques, sous les pressions sélectives liées au milieu aquatique.

III. Évolution des familles de gènes

Dans la présente étude, nous avons caractérisé des gènes et établi leurs patterns d'expression pendant le développement du Céphalopode *S. officinalis*. Des approches fonctionnelles nous ont également permis d'affecter des rôles à certains de ces gènes. Les familles étudiées sont les familles des gènes *Pax*, le cluster *NK* ainsi que *shh* et *Nodal*. Ces groupes de gènes sont connus pour avoir des rôles essentiels dans la mise en place des axes du corps (*shh*, *Nodal*), l'organisation du système nerveux (*shh*, *Pax6*), mais également la myogenèse (*NK4*, *Pax2/5/8*). Dans cette troisième et dernière partie, nous proposons de faire un bilan et d'inférer des hypothèses quant à la place des gènes caractérisés chez *S. officinalis* au sein de l'évolution de leurs familles respectives.

1. La famille *Pax*

Les gènes *Pax* forment une grande famille de facteurs de transcription qui jouent des rôles clés au niveau du développement embryonnaire chez tous les Métazoaires. La caractéristique principale de la famille des gènes *Pax* est la présence d'une « paired-box » de 384 pb qui code pour un domaine de liaison à l'ADN de 128 acides aminés (pour revue : Noll, 1993).

Les gènes *Pax* sont divisés en plusieurs groupes :

- groupe I : *Pax1*, *Pax9*
- groupe II : *Pax2*, *Pax5*, *Pax8*
- groupe III : *Pax3*, *Pax7*
- groupe IV : *Pax4*, *Pax6*

Deux groupes présentant un homéodomaine complet, les groupes III et IV, sont assez éloignés, tandis que les groupes I et III d'une part, et II et IV d'autre part, formeraient deux sous-groupes de par leur homologie structurelle. Le groupe I comprenant *Pax1* et *Pax9*, présente un domaine paired, un octapeptide mais pas d'homéoboîte ; le groupe II, *Pax2*, *Pax5* et *Pax8*, contient les 3 domaines, avec un homéodomaine tronqué ; le groupe III, *Pax3* et *Pax7*, présente également les 3 domaines mais l'homéodomaine n'est pas tronqué ; enfin, le groupe IV, *Pax6* et *Pax4*, montre un domaine paired et un homéodomaine mais pas d'octopeptide (Walther and Gruss, 1991). Ces quatre groupes majeurs ont émergé avant la divergence entre les Ecdysozoaires et les Vertébrés.

Le domaine paired du groupe I partage un ancêtre commun avec le gène *Pox meso* de la drosophile, le groupe II avec le gène *Pox neuro*, le groupe III avec *paired (prd)*, *gooseberry (gsb)* et *gooseberry neuro (gsbn)* et le groupe IV avec *eyeless* (fig. 38). Chez la drosophile, les trois gènes *gsb*, *gsbn* et *prd* sont les produits de deux événements de duplication. Le premier a donné naissance à *prd* d'un côté et *gsb/gsbn* de l'autre, tandis que la deuxième duplication a permis l'émergence de *gsb* et *gsbn* (Balczarek et al., 1997). La présence des gènes *Pax2*, *Pax5* et *Pax8* chez les téléostéens et les mammifères (fig. 39) ainsi que le haut degré de similitude entre leurs séquences suggèrent fortement que leur origine résiderait dans une duplication d'un gène ancestral commun qui se serait produite avant ou au moment de la divergence de la lignée des Vertébrés (Pfeffer and Busslinger, données non publiées) (fig. 39).

Vertébrés (Noil, 1993)	Urochordés	Drosophila	Cnidaires	Spongiaires	Lophotrochozoaires	Céphalopodes
<i>Pax1</i>	<i>Pax1/9</i> (Ogasawara et al., 1999)	<i>Pox meso</i> (Bopp et al., 1989)			<i>TiPax1/9</i> (Hejino, 2010)	
<i>Pax9</i>						
<i>Pax2; Pax2a, Pax2b</i> (téléostéens)	<i>Pax2/5/8a</i> , <i>Pax2/5/8b</i> (Wada et al., 1998)	<i>Pax2/5/8</i> (Czerny et al., 1997), <i>Sparkling</i> , <i>Pox neuro</i> (Bopp et al., 1989)		<i>sPax-2/5/8</i> (Hoshiyama et al., 1998) ou <i>PaxB</i> (Hill et al., 2010)	<i>Pax2/5/8</i> (O'Brien et Degnan 2000), <i>Paxβ1</i> , <i>Paxβ2</i> (Schmerer et al., 2009)	<i>Pax2/5/8</i> (Navet et al., 2009, non publié)
<i>Pax5</i>						
<i>Pax8</i>						
<i>Pax4</i>			<i>Pax6</i> (Tomarev et al., 1997; Hartmann et al., 2003; Navet et al., 2009)		<i>Pax4/6</i> (Hartmann et al. 2003)	
<i>Pax6</i>	<i>Pax6</i> (Gladrion et al., 1997)	<i>eyeless</i> (Quiring et al., 1994)				
<i>Pax3</i>		<i>Paired</i> (Kilchherr et al. 1986), <i>gooseberry</i> , <i>gooseberry neuro</i> (Gutjahr et al., 1993)	<i>Pax-D1</i> (Hoshiyama et al., 2007)		<i>Pax3/7</i> (Denes et al., 2007; Woodruff et al., 2007)	<i>Pax3/7</i> (Navet et al., non publié)
<i>Pax7</i>	<i>Pax3/7</i> (Wada et al., 1996)					

Figure 38 : Tableau représentant les homologues des gènes de la famille *Pax* décrits jusqu'ici dans les principaux groupes phylogénétiques étudiés. Les cases grisées signifient que le gène correspondant serait absent du groupe.

1.1. *PaxB*, à l'origine des gènes *Pax2/5/8* et *Pax6*

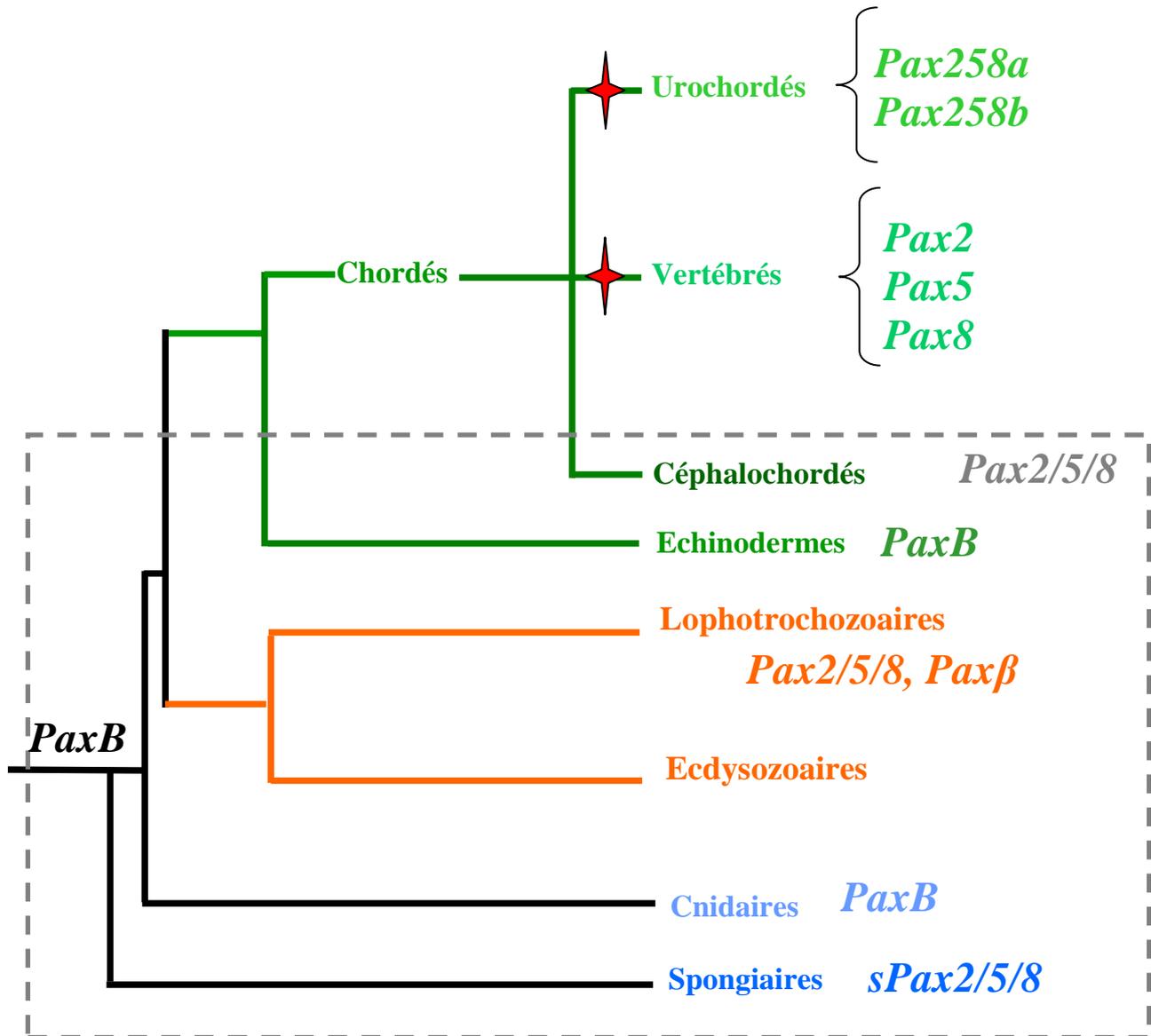
En 2000, Gröger et al. caractérisent un gène de la famille *Pax* chez un Cnidaire, *Podocoryne carnea*. Il s'agit de *PaxB*, très proche de *Pax2/5/8* d'après des comparaisons de séquences. Les chercheurs démontrent pour ce gène un rôle probable dans le développement nerveux, mais pas dans le développement musculaire, le gène n'est pas exprimé dans les cellules musculaires en développement ou adultes. Des expressions de *Pax2/5/8* au niveau musculaire n'ont été décrites que chez des Mollusques comme l'abalone *Haliotis asinina* chez laquelle le gène s'exprime en particulier dans les muscles de la coquille et dans le pied (O'Brien and Degnan, 2003). Chez le Céphalopode *S. officinalis*, nous avons montré des expressions importantes dans toutes les structures musculaires dérivées du pied des Mollusques, bras et entonnoir, mais également dans le manteau à partir de stades très précoces. Jamais une aussi grande implication de *Pax2/5/8* dans la myogenèse n'avait été montrée jusqu'ici. Il semblerait que le recrutement de *Pax2/5/8* pour la formation des tissus musculaires soit secondaire au niveau de la divergence des Lophotrochozoaires. Dans la lignée des Céphalopodes, un recrutement massif de ce gène concomitamment à la formation de structures musculaires à fonction locomotrice, spécifiques aux Céphalopodes a pu être de première importance pour leur adaptation au milieu aquatique.

Dans la mesure où tous les gènes de la famille *Pax* dérivent d'un seul gène ancêtre commun, il n'est pas impossible que certains gènes puissent avoir des patterns d'expression et des rôles en commun. Le gène ancestral devait probablement avoir de multiples fonctions chez des organismes moins complexes que les Bilatériens, chez lesquels ce gène s'est dupliqué, permettant ainsi la sous-fonctionnalisation de multiples gènes. Ces gènes auraient alors participé à la diversification des organismes bilatériens.

Le gène *PaxB* a été également caractérisé en 2003 chez une autre méduse, *Tipedalia cystophora* (Kozmik et al., 2003). Chez cet organisme, *PaxB* est exprimé dans les organes photosensibles et les statocystes. Ce gène a des propriétés doubles du type *Pax6* et *Pax2/5/8*. Sa structure présente un octapeptide, caractéristique des gènes *Pax2/5/8* ; de la même façon, le domaine de transactivation en C-terminal montre une structure se rapprochant beaucoup plus de *Pax2/5/8* que de *Pax6* (Kozmik et al., 2003). Une des spécificités de *Pax6* est que ce gène est suffisant pour induire des yeux ectopiques chez la

Drosophile en se liant via son domaine paired au promoteur de l'homologue de *Pax6* chez la Drosophile, *ey* (Nornes et al., 1998). Or, *PaxB* a également montré cette capacité et il en est de même pour l'homologue de *Pax2/5/8* chez la drosophile.

Avant la divergence entre les « diploblastiques » et les triploblastiques, le gène *Pax*, déjà associé aux organes photosensibles, avait à la fois les propriétés de *Pax6* et celles de *Pax2/5/8*. Celles-ci se sont ensuite distinguées dans la lignée des Vertébrés. Cependant, certaines fonctions ont pu être conservées dans les deux gènes tel que le rôle dans la formation des yeux comme montré chez *Drosophila* (Kozmik et al., 2003). Pendant le développement de *S. officinalis*, le gène *Pax6* s'exprime au niveau des vésicules optiques dès le début de l'organogenèse. Cette expression persiste ensuite et s'étend aux lobes optiques. Le gène *Pax2/5/8* montre également des expressions au niveau optique, rappelant le phénomène de conservation de fonction entre gènes d'une même famille déjà observé chez la Drosophile (Kozmik et al., 2003). Cependant, *Pax6* est exprimé beaucoup plus précocement que *Pax2/5/8* et *Pax2/5/8* n'est pas exprimé dans les lobes optiques mêmes, mais au niveau des tractus optiques. *Pax6* apparaît donc comme un gène maître dans la formation des yeux, avec un rôle dans l'organisation des lobes optiques, tandis que *Pax2/5/8* intervient plus tardivement, et de façon plus transitoire pendant le développement de *S. officinalis*. Il semblerait donc que ces deux gènes se soient différenciés en ce qui concerne leurs fonctions respectives dans la formation des organes photosensibles de la seiche. Toutefois, cette complémentarité apparente dans les rôles de ces gènes n'exclut pas que *Pax2/5/8* soit capable de relayer *Pax6* et d'avoir les mêmes propriétés, même si celles-ci ne sont pas exploitées du fait de la présence de *Pax6*. Seules des expériences d'inactivation de gènes pourraient aider à résoudre cette question.



Deutérostomiens

Protostomiens

★ duplications de gènes

Figure 39 : Évolution possible du gène *Pax2/5/8*. *PaxB* pourrait être à l'origine de *Pax6* et *Pax2/5/8*.

1.2. *Pax2/5/8*

Au niveau de la séquence du gène *Pax2/5/8* de *S. officinalis*, on trouve bien un domaine paired (fig. 40, en bleu), une séquence du type octapeptide ((GST)YSINGILG(I), en vert) et une zone KR (fig. 40 en violet), riche en lysine et arginine, signalée par Bassham et al. en 2008 pour les gènes *Pax2*, *Pax5* et *Pax8* de Vertébrés. En revanche, on n'observe pas d'homéodomaine évident. On ne retrouve notamment pas le début de l'homéodomaine, à savoir une tyrosine suivie d'une phénylalanine ou encore une séquence QLE ou FE. De façon générale, les domaines paired, que ce soit celui de *Pax2/5/8* d'un côté ou celui de *Pax6* de l'autre, sont très conservés au sein des Lophotrochozoaires. Les séquences partagent plus de 75% d'identité dans tous les cas (fig. 41).

1.2.1. Rôle ancestral de PAX2/5/8

Pax2/5/8 s'exprime au niveau des branchies pendant l'embryogenèse de *S. officinalis*. Ce type d'expression dans les branchies a déjà été relevé chez d'autres organismes : l'Urochordé *Oikopleura dioica* (Bassham et al., 2008) et l'amphioxus, un Céphalocordé (Kozmik et al., 1999). De plus, PAX2 jouerait un rôle dans la perforation des branchies chez *Xenopus* (Heller and Brändli, 1999). Une des fonctions ancestrales du gène pourrait donc être liée à la perforation et à la fusion de couches épithéliales. Cette hypothèse est corroborée par l'expression de *Pax2/5/8* au niveau du sac coquillier chez *S. officinalis* d'une part, et au niveau de la cavité palléale d'*H. asinina* d'autre part. Le rôle de PAX2/5/8 dans la formation de cavités semble avoir été largement conservé.

1.2.2. PAX2/5/8 et engrailed, un lien moléculaire conservé ?

Chez les Vertébrés, les membres de la famille *Pax2/5/8* régulent directement le gène *engrailed* dans la mise en place de la frontière entre le cerveau postérieur et le cerveau moyen (Song et al., 1996). Le rôle dans la mise en place de frontières entre différentes parties du SNC paraît peu probable chez *S. officinalis*, étant donné la presque absence d'expression de *Pax2/5/8* dans le SNC. Effectivement, *Pax2/5/8* ne s'exprime qu'au niveau du tractus optique, et ce, de façon très transitoire. Par contre, il est possible qu'un tel lien existe entre *engrailed* et *Pax2/5/8* dans la zone du sac coquillier. En 2007, Baratte et al. montrent la présence de la protéine Engrailed dans les bords du sac coquillier à des stades très précoces de l'organogenèse (stades 16 et 17). *Pax2/5/8*, quant à lui, s'exprime dans les bordures du sac coquillier à des stades plus tardifs, avec un pic d'expression au stade 25. Cette chronologie entre la synthèse de la protéine Engrailed à des stades précoces et l'expression du gène *Pax2/5/8* à des stades plus tardifs suggère une collaboration entre ces deux gènes pour la mise en place du sac coquillier pendant le développement de *S. officinalis*. Ce lien a été démontré au niveau moléculaire chez un Vertébré, mais dans une structure tout à fait différente, le cerveau. Néanmoins, on sait que dans certains cas, seule la fonction moléculaire de deux protéines homologues, mais pas leur fonction biologique, a été conservée au cours de l'évolution. Cette conservation peut s'accompagner de la réutilisation d'une partie de la cascade régulatrice associée (Bally-Cuif, 2000).

Pax6

Séquence 1	Séquence 2	Pourcentage d'identité
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Euprymna scolopes</i> (Mollusque, Céphalopode)	94%
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Haliotis asinina</i> (Mollusque, Gastropode)	80%
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Ilyanassa obsoleta</i> (Mollusque, Gastropode)	80%
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Platynereis dumerilii</i> (Lophotrochozoaire Annélide)	77%

Pax2/5/8

Séquence 1	Séquence 2	Pourcentage d'identité
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Crepidula fornicata</i> (Mollusque, Gastropode)	87%
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Platynereis dumerilii</i> (Lophotrochozoaire Annélide)	80%

Pax3/7

Séquence 1	Séquence 2	Pourcentage d'identité
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Capitella</i> sp (Mollusque, Gastropode)	77%
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Helobdella obsoleta</i> (Lophotrochozoaire Annélide)	76%
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> (Ecdysozoaire, Arthropode)	42%

Figure 41 : Pourcentages d'identité entre les séquences nucléotidiques de *S. officinalis* et celles d'autres organismes pour les gènes caractérisés de la famille *Pax*.

1.2.3. *Pax3/7*, une interchangeabilité possible avec *Pax2/5/8* ?

Nous avons pu déceler la présence du gène *Pax3/7* chez *S. officinalis* au sein de la banque d'ESTs faite à partir des stades de développement 15 à 30 (correspondant au début de l'organogenèse) de *S. officinalis*. Il a été montré que ce gène était exprimé, entre autres, au niveau du tissu mésodermique des néphridies en développement de la sangsue (Woodruff et al., 2007). Son pattern d'expression reste encore à déterminer chez *S. officinalis*. Nous n'avons cependant pas pu caractériser *Paxβ*, gène lié à la formation de tissus mésodermiques chez de nombreux Lophotrochozoaires (Schmerer et al., 2010). L'absence possible de ce gène dans le génome de *S. officinalis* pourrait expliquer un recrutement du gène *Pax2/5/8* pour des fonctions nouvelles. La présence de *Pax3/7* pourrait, quant à elle, suggérer une interchangeabilité avec le gène *Pax2/5/8* du fait de leurs fonctions possiblement similaires. En effet, *Pax2/5/8* montre une intervention majeure dans le développement de structures musculaires dérivées du pied des Mollusques pendant l'embryogenèse de *S. officinalis*, tandis que *Pax3/7* est connu pour avoir un rôle important dans la mise en place des muscles squelettiques, donc à fonction locomotrice chez les Vertébrés (Buckingham and Relaix, 2007 ; Kassar-Duchossoy et al., 2005).

Le rôle de *Pax6* dans la mise en place du SNC et de la zone optique semble avoir été conservé chez les Céphalopodes. Cependant, ces deux structures, cerveau et yeux, sont justement des structures convergentes majeures par rapport aux Vertébrés. Le gène *Pax6* a donc bel et bien été recruté pour la formation de structures analogues, confortant *Pax6* dans son statut de « gène maître », notamment, dans la formation des structures photosensibles. Le cas de *Pax2/5/8* paraît plus compliqué. Le rôle de régionalisation du SNC des gènes *Pax2*, *Pax5* et *Pax8* est bien établi chez les Vertébrés (Wada et al., 1998). Ce rôle ne se retrouve absolument pas chez *S. officinalis* malgré la présence d'un véritable cerveau. Il semblerait plutôt que ce gène ait été recruté pour une fonction dans la mise en place de tissus mésodermiques chez les Lophotrochozoaires (abalone, sangsue). Chez les Mollusques, s'ajoute un rôle dans la mise en place de la coquille comme on l'observe chez *S. officinalis*, et dans le pied et les structures dérivées du pied, bras et entonnoir, pour *S. officinalis*, soit des structures mésodermiques à destinée musculaire. *Pax2/5/8* est sans doute un des gènes ayant participé à la mise en place de ces structures à fonction

locomotrice pendant l'évolution, peut-être en lieu et place de *Pax3/7*. Cependant, il est également possible que *Pax3/7* s'exprime de façon si restreinte qu'il n'est pas détectable dans la banque ESTs.

2. La famille *NK*

2.1. Origine du cluster *NK*

Les gènes *NK* auraient pour origine le megacluster ANTP, pour « Antennapedia », qui a aussi donné les gènes *Hox* et *ParaHox* (Garcia-Fernandez, 2005). L'ancêtre commun des Protostomiens et Deutérostomiens devait posséder un cluster de 9 gènes *NK* : *Msx*, *NK4/tinman*, *NK3/bagpipe*, *Lbx/ladybird*, *Tlx/cl5*, *NK7*, *NK6/hgtx*, *NK1/slouch* et *NK5/Hmx* (fig. 42). Des duplications au cours de l'évolution des Métazoaires auraient entraîné différents états de clusterisation et de dispersion des gènes dans les diverses lignées. Des clusters de gènes *NK* ont été caractérisés chez une éponge *Amphimedon queenslandica*, ce qui suggère que le regroupement des gènes à homéoboîte du megacluster ANTP a eu lieu avant la divergence d'avec les Bilateria et les Cnidaires (Larroux et al., 2007). Par contre, aucun gène *Hox* ou *ParaHox* n'a été identifié chez ce même organisme, ce qui peut signifier soit que ces gènes trouvent leur origine après la divergence entre les Spongiaires et les Eumétazoaires, soit qu'ils ont été secondairement perdus, la première solution étant la plus parcimonieuse (Larroux et al., 2007). Le maintien du cluster *NK* chez les éponges et les bilatériens au cours de l'évolution reflète les contraintes qui pèsent sur les mécanismes régulateurs du développement et qui doivent être inhérentes à l'organisation de ce cluster.

	Mammifères (revue : Wotton et al., 2009)	<i>Drosophila</i>	Cnidaires (Ryan et al., 2006)	Spongiaires (Fahey et al., 2008)	Lophotrochozoaires	Céphalopodes
NK1	Nkx1.2	<i>slouch</i> (S59) (Knirr et al., 1999)	NK1		NK1 (Saudemont et al., 2008)	
NK2.1	Nkx2.1, Nkx2.4	<i>scarecrow</i> (<i>scro</i>) (Zaffran et al., 2000)			NK2.1 (Saudemont et al., 2008)	NK2.1 (Navet et al., 2010, non publié)
		<i>ventral nervous system defective</i> (<i>vnd</i>) (Jimenez et al., 1995)	NK2			
NK2.2	Nkx2.2, Nkx2.8	<i>bagpipe</i> (Azpiazu et Frasch, 1993)	NK3		NK2.2 (Denes et al., 2007)	
NK3	Nkx3.1, Nkx3.2, Nkx3.3,	<i>tinman</i> (Azpiazu et Frasch, 1993)			NK3 (Saudemont et al., 2008)	
NK4	Nkx2.3, Nkx2.5, Nkx2.6			NK2/3/4	NK4 (Saudemont et al., 2008)	NK4 (Elliott et al., 2006, Navet et al., 2008)
NK5/Hmx	Nkx5.3/Hmx1, Nkx5.3/Hmx2, Nkx5.1/Hmx3, Nkx5.4/Hmx4	<i>Hmx</i> (Wotton et al., 2009)	<i>Hmx</i>		NK5 (Saudemont et al., 2008)	
		<i>hgtx</i> (Jagla et al. 2001)	NK6			
NK6	Nkx6.1, Nkx6.2, Nkx6.3	<i>Nk7</i>	NK7		Nk6 (Denes et al., 2007)	
NK7						
Lbx	Lbx1, Lbx2	<i>Ladybird early</i> (<i>lbe</i>), <i>Ladybird late</i> (<i>lbl</i>) (Jagla et al., 1997)	<i>lbx</i>		Lbx (Saudemont et al., 2008)	Lbx (Farfan et de Couet, 2004, non publié)
		<i>muscle segment homeobox</i> (<i>msh</i>) ou <i>drop</i> (Lord et al., 1995)				
<i>msx</i>	<i>Msx1</i> , <i>Msx2</i> , <i>Msx3</i>		<i>msx</i> (Galle et al., 2005)	<i>Msx</i> (Lairoux et al., 2007)	<i>Msx</i> (Denes et al., 2007; Saudemont et al., 2008)	<i>Msx</i> (Buresi et al., 2010, non publié)

Figure 42 : Tableau représentant les homologues des gènes du cluster NK décrits jusqu'ici dans les principaux groupes phylogénétiques étudiés. Les cases grisées signifient que le gène correspondant serait absent du groupe.

La possibilité d'organiser les cellules le long d'un axe primaire du corps devait exister avant l'origine des gènes ProtoHox. L'apparition des ProtoHox a sans doute contribué à une complexification des morphologies et de l'organisation du corps.

Chez la drosophile, ont été caractérisés Tinman (NK4), bagpipe (NK3), ladybird early et ladybird late, slouch (NK1), scro (NK2.1), vnd (NK2.2), drop (Msx), NK7 et NK6 (Jagla et al., 2001) (fig. 42).

Pendant l'évolution des Vertébrés à mâchoire, plusieurs duplications de génome se sont produites, ce qui a eu pour conséquence de créer de multiples copies des gènes NK. Les phénomènes de crossing-over n'ont fait qu'augmenter cette diversité et permettre des sous-fonctionnalisations. Les gènes ainsi dupliqués ont alors pu acquérir de nouvelles fonctions et, de cette façon, se différencier des gènes d'origine. Les gènes appartenant au cluster NK sont donc nombreux chez les Vertébrés (*cf.* tableau).

Chez les Mollusques, les seuls travaux qui ont été menés à propos du cluster *NK* ont été réalisés sur les Céphalopodes. En 2006, Elliott et al. caractérisent le gène *NKx2.5* (*NK4*) chez *Loligo pealii*. Cependant, ils ne montrent de pattern d'expression que sur un stade tardif du développement (stade 26) dans le cœur systémique et dans le sac d'encre. Nous avons, pour notre part, caractérisé les gènes *NK4* et *NK2.1* chez *S. officinalis*. D'autres gènes appartenant au megacluster ANTP ont également été identifiés : *msx* et *gsx* (gènes paraHox) et *otx* (gène à homéoboîte).

2.2. Les gènes NK2

Chez les Lophotrochozoaires, Saudemont et al. (2008) caractérisent les gènes *NK1*, *NK2.1*, *NK3*, *NK4* et *NK5* chez *Platynereis*. La même année, Denes et al. identifient également les gènes *NK2.2* et *NK6* chez ce même annélide. Seul *NK7* n'a pas été caractérisé pour le moment. Il semblerait, cependant, que tous ces gènes étaient présents chez l'ancêtre commun des Lophotrochozoaires et que la duplication de *NK2* donnant *NK2.1* et *NK2.2* ait déjà eu lieu au moment de la divergence de cette lignée.

Nous avons cherché à caractériser le gène *NK2.2* qui intervient dans la voie moléculaire SHH et qui présente des rôles dans la détermination et différenciation des

territoires nerveux chez les Vertébrés (Ericson et al., 2006). Ce gène n'a pu être caractérisé même avec l'aide de la banque d'ESTs. Son expression durant le développement de *S. officinalis* est pourtant très probable. Le gène *shh* n'a pas été retrouvé non plus au sein de la banque (son amplification a été rendue possible grâce à des amorces dégénérées) et, cependant, nous avons montré son expression au cours de l'embryogenèse chez la seiche. Par ailleurs, *NK2.2* a été caractérisé chez le Lophotrochozoaire *P. dumerilii* (Denes et al., 2007) et tout porte à croire qu'il existe bel et bien dans la lignée des Céphalopodes. Son expression est sans doute trop faible pour pouvoir être détectée dans la banque. Cela pourrait traduire un rôle mineur pour ce gène ou, du moins, une expression faible et transitoire, comme c'est d'ailleurs le cas pour *shh*. En ce qui concerne *NK2.1*, nous avons observé une expression assez large autour de la bouche à des stades précoces (fig. 43). Ce gène est associé au développement de structures appartenant au tube digestif chez de nombreux autres groupes. Chez la drosophile, *NK2.1/Scarecrow* est exprimé dans le pharynx en développement (Zaffran et al., 2000). Chez les Vertébrés, *Nkx2.1* est impliqué dans le développement de la thyroïde et des poumons, deux structures dérivées du tube digestif (Minoo et al., 1999), et chez le Lophotrochozoaire Annélide *Platynereis*, le gène est exprimé dans le bulbe buccal (Tessmar-Raible et al., 2007). Il semblerait donc que cette fonction dans des tissus d'origine endodermique ait été conservée au cours de l'évolution.

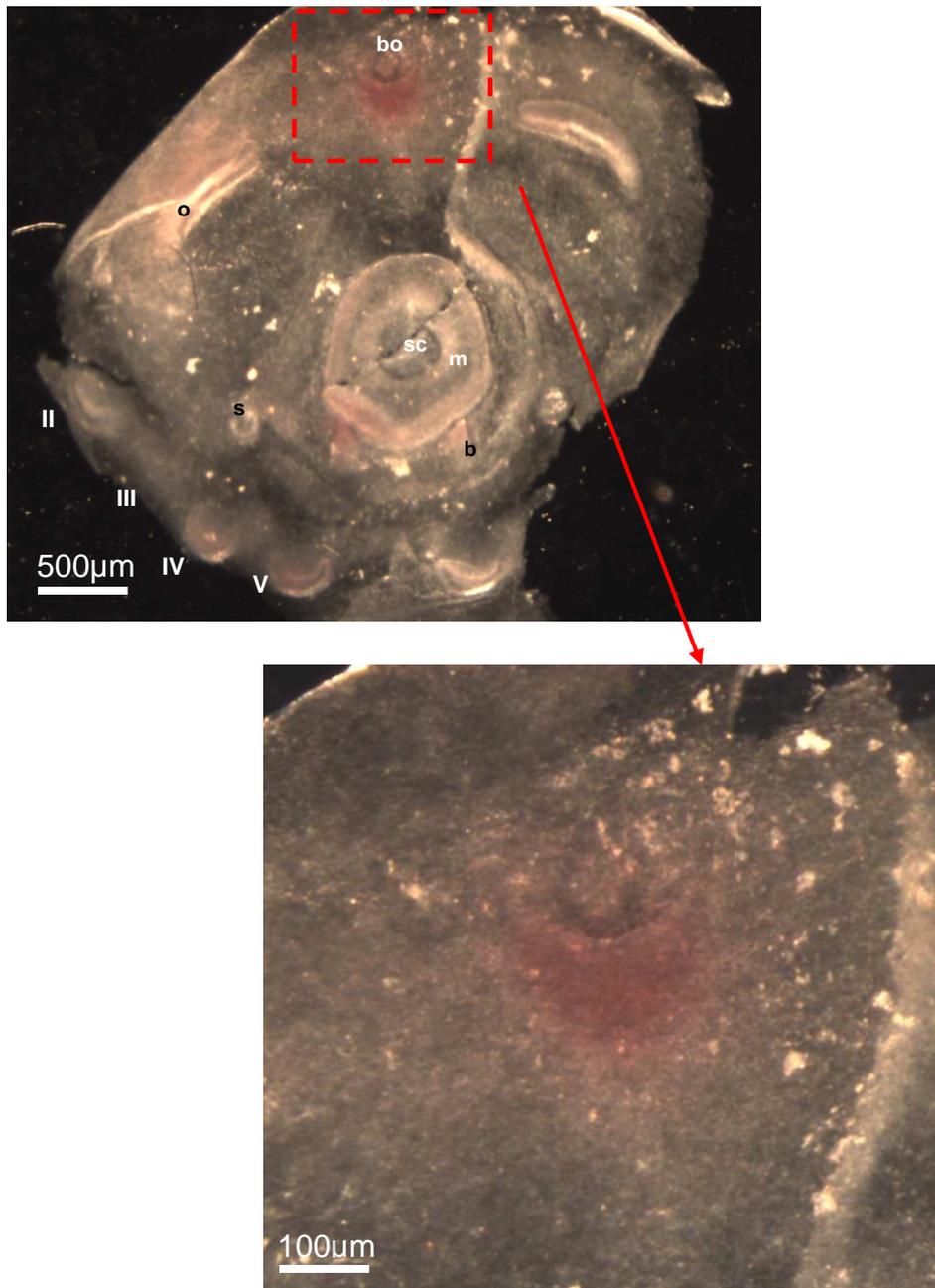


Figure 43 : Expression de *NK2.1* au stade 16 de l'embryogenèse de *S. officinalis*.
Hybridation *in situ in toto*.

2.3. *NK4*

On retrouve bien l'homéodomaine de 60 acides aminés dans les séquences *NK2.1* et *NK4* de *S. officinalis* (fig. 44). L'homéodomaine du gène *NK4* de *S. officinalis* porte bien une tyrosine en position 260, une caractéristique des gènes dits de la famille de *NK2*, en référence à la terminologie des gènes *NK* chez les Vertébrés (l'homologue de *NK4* est nommé *Nkx2.5* chez les Vertébrés). Cet acide aminé serait essentiel à la spécificité du site de liaison à l'ADN (Tsao et al., 1994).

En 2006, Elliott et al. définissent un nouveau domaine, le domaine YRD, conservé dans la séquence du gène *Nkx2.5*. Ce domaine aurait coévolué avec l'homéodomaine. Des mutations au niveau de cette zone n'affectent pas la liaison à l'ADN mais le domaine YRD serait essentiel à la fonction du gène dans la cardiogenèse chez l'embryon, d'après des expériences *in vivo* sur embryons de souris. Le domaine YRD des Céphalopodes contient 4 tyrosines (fig. 44, flèches rouges). La comparaison des séquences montre 72% d'identité avec la séquence de *Nkx2.5* de *Danio rerio* et seulement 32% avec la séquence de *tinman* de *Drosophila melanogaster* (fig. 45). Il semblerait que l'architecture de l'homéodomaine de *NK4* ait été établie avant la divergence entre les Protostomiens et les Deutérostomiens et que *tinman* ait beaucoup dérivé.

Le gène *NK4*, associé jusqu'ici au développement des muscles cardiaques (Harvey, 1996 ; Mann and Carroll, 2002 ; Lints and al., 1993 ; Kim and Nirenberg, 1989 ; Okkema et al., 1997), s'exprime dans les tissus mésodermiques des bras, manteau et entonnoir, des structures à fonction locomotrice pendant le développement de *S. officinalis*. Chez la sépiole *Eurpymna scolopes*, six gènes *Hox* sont exprimés dans le SNC. Les gènes *Hox* sont exprimés au niveau de la couronne brachiale, du tube de l'entonnoir et dans le ganglion stellaire (Lee et al., 2003).

Les gènes appartenant au cluster ANTP semblent donc avoir eu des rôles essentiels dans le développement de nouvelles structures morphologiques liées à la fonction de locomotion dans la lignée des Céphalopodes. Le recrutement massif de gènes *Hox*, mais également de gènes appartenant au cluster *NK* pour la mise en place du manteau, des bras et de l'entonnoir, semble avoir été un des mécanismes majeurs ayant contribué à l'adaptation de ce groupe au milieu aquatique.

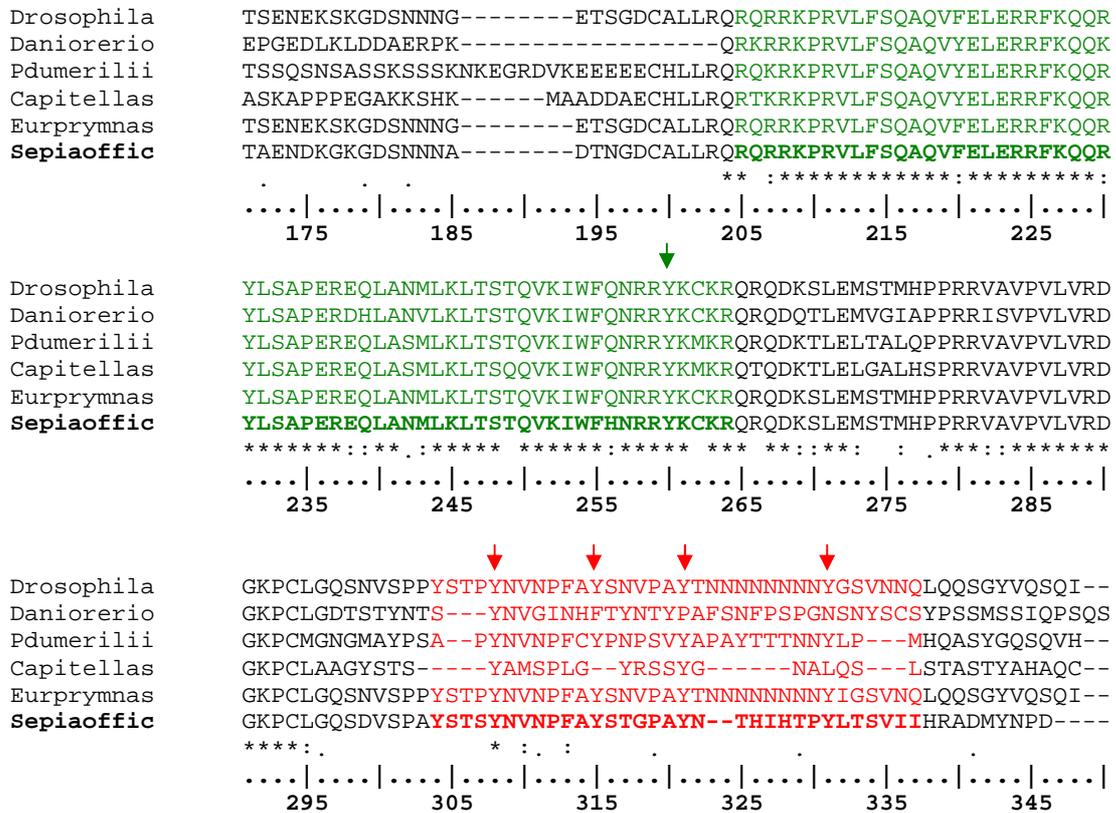


Figure 44 : Alignement des séquences protéiques partielles de NK4.

homéodomaine, zone YRD, ↓ : tyrosine conservée

Euprymna scolopes (Mollusque, Céphalopode), *Sepia officinalis* (Mollusque, Céphalopode), *Platynereis dumerilii* (Lophotrochozoaire, Annélide), *Capitella* sp. (Lophotrochozoaire, Annélide), *Drosophila melanogaster* (Ecdysozoaire, Arthropode), *Danio rerio* (Vertébrés, Téléostéens)

NK4

Séquence 1	Séquence 2	Pourcentage d'identité
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Euprymna scolopes</i> (Mollusque, Céphalopode)	83%
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Capitella</i> sp (Mollusque, Gastropode)	74%
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Platynereis dumerilii</i> (Lophotrochozoaire Annélide)	73%
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Danio rerio</i> (Vertébrés, téléostéen)	72%
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> (Ecdysozoaire, Arthropode)	32%

NK2.1

Séquence 1	Séquence 2	Pourcentage d'identité
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Platynereis dumerilii</i> (Lophotrochozoaire Annélide)	74%
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> (Ecdysozoaire, Arthropode)	72%
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Danio rerio</i> (Vertébrés, Téléostéen)	44%

Figure 45 : Pourcentages d'identité entre les séquences nucléotidiques de *S. officinalis* et celles d'autres organismes pour les gènes caractérisés du cluster NK.

3. *Shh*

La séquence de *shh* de *S. officinalis* montre plus de 70% d'identité avec les séquences des Céphalopodes et Gastropodes présentées (fig. 46), ce qui est congruent avec leur appartenance commune aux Mollusques. Le plus surprenant est le pourcentage d'identité très élevé avec la séquence de *Mus musculus*, un Vertébré Mammifère. Chez les Vertébrés, les principaux rôles de SHH concernent la mise en place de l'axe nerveux central, avec son rôle dans la différenciation neuronale au niveau ventral (McMahon et al., 2003). Chez la seiche, certaines des expressions observées pour *shh* semblent être indépendantes des axes antéro-postérieur et dorso-ventral. C'est le cas notamment pour les patterns au niveau des bras. *Shh*, pourtant très lié à cet axe chez les Vertébrés (Ericson et al., 1997b), est exprimé tout le long de la corde nerveuse brachiale dans les stades tardifs du développement. Cela suggère que ce gène a pu être co-opté pour fonctionner dans divers contextes développementaux, sans nécessairement être relié aux axes du corps. La fonction de SHH dans la mise en place des bras des Céphalopodes peut être rapprochée de celle du gène homologue dans la mise en place des membres des Vertébrés. *Shh* est exprimé par la Zone d'Activité Polarisante (ZPA), zone située dans la région postérieure des membres, et en établit le pattern antéro-postérieur (Johnson and Tabin, 1995 ; Dahn et al., 2007). L'expression précoce de *shh* dans les bourgeons des bras de *S. officinalis* des stades 16 à 20 peut être liée à une polarisation des bras et tentacules. Cette hypothèse conduit à penser que le rôle de SHH dans la mise en place des bras de *S. officinalis* serait de deux types à différents moments de l'embryogenèse : d'abord, la régulation de l'orientation des membres à des stades précoces (16 à 20), puis le contrôle de la mise en place du système nerveux associé dans les stades tardifs (21 à éclosion). Quoiqu'il en soit, la conservation de séquence du gène *shh* entre Céphalopodes et Vertébrés n'est pas forcément à rapprocher avec une conservation des rôles respectifs de ces homologues. Le recrutement du gène pour de nouvelles fonctions, ou des fonctions similaires dans des structures différentes n'est pas allé de pair avec des modifications majeures de la séquence du gène.

Shh

Séquence 1	Séquence 2	Pourcentage d'identité
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Euprymna scolopes</i> (Mollusque, Céphalopode)	83%
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Octopus bimaculoides</i> (Mollusque, Céphalopode)	78%
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Patella vulgata</i> (Mollusque, Gastropode)	77%
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Haliotis asinina</i> (Mollusque, Gastropode)	72%
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Mus musculus</i> (Vertébrés, Mammifère)	75%
<i>Sepia officinalis</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> (Ecdysozoaire, Arthropode)	38%

Figure 46 : Pourcentages d'identité entre les séquences nucléotidiques de *S. officinalis* et celles d'autres organismes pour le gène *shh*.

Au sein de la famille des gènes *Pax*, *Pax6*, *Pax2/5/8* et *Pax3/7* sont présents et exprimés au cours du développement de *S. officinalis*. Seul le gène *Pax1/9* n'a pas été trouvé. Ce gène n'a été décrit que chez un Lophotrochozoaire Brachiopode, *Terebratula transversa* (Hejnol, 2010) mais jamais encore chez un Mollusque. Sa perte dans ce groupe n'est pas impossible à envisager. Les autres gènes *Pax* caractérisés montrent que les gènes « en place » au moment de la divergence des Lophotrochozoaires le sont restés dans la lignée des Mollusques et celle des Céphalopodes. Quant aux gènes du cluster *NK*, *NK2.2* reste crucial à caractériser du fait de son intervention connue dans la cascade *shh* chez les Vertébrés (Ericson et al., 1997b). Celui-ci a été décrit chez *Platynereis dumerilii*, un Lophotrochozoaire, par Denes et al. en 2007. Cela laisse penser que ce gène est bien présent chez les Céphalopodes. Il en est de même pour le gène *NK6*, intervenant également dans la régionalisation du système nerveux chez les Vertébrés (Prakash and Wurst, 2006).

Les séquences des gènes étudiés, *Pax6*, *Pax2/5/8*, *Pax3/7*, *NK4*, *NK2.1* et *shh* sont globalement bien conservées chez *S. officinalis*. Il ne faut cependant pas occulter le fait que les portions de séquences comparées comportent justement les domaines les mieux conservés dans le règne animal de façon générale, les résultats décrits ici ne sont pas déduits des séquences entières. Les nombreux remaniements dans les expressions et potentiels rôles des gènes étudiés pendant le développement de *S. officinalis* pourraient ne pas être dus à des modifications profondes dans leurs séquences. Les mêmes mécanismes moléculaires que ceux décrits chez des Vertébrés ou Ecdysozoaires seraient impliqués mais dans de nouveaux contextes structuraux, en liaison avec le développement d'une fonction cruciale dans l'adaptation au milieu aquatique, la locomotion, et plus précisément la locomotion par propulsion à réaction observée chez les Teuthidae et les Sepiidae dont fait partie la seiche.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les Céphalopodes possèdent un plan de corps très dérivé en comparaison d'autres groupes de Mollusques. Nombre des innovations morphologiques observées dans leur lignée sont liées à la locomotion, fonction indispensable dans les processus adaptatifs à l'environnement. C'est pourquoi nous avons choisi de faire un focus sur les systèmes directement impliqués dans cette fonction : les systèmes nerveux et musculaire. Etudier l'implication de gènes développementaux dans la mise en place du système neuromusculaire pendant l'embryogenèse du Céphalopode *S. officinalis* a permis d'approcher quelques-uns des mécanismes à l'origine de l'émergence des innovations morphologiques liées à la locomotion. Nous nous sommes intéressés principalement à trois familles de gènes, *Pax*, *NK* et *shh*, du fait de leurs rôles majeurs dans la mise en place du système nerveux et musculaire montrés chez les espèces étudiées jusqu'à présent, majoritairement, des modèles « conventionnels » appartenant aux Vertébrés ou aux Ecdysozoaires. Ces données nous ont permis non seulement d'accroître les données déjà disponibles pour comprendre l'histoire évolutive des familles de gènes étudiées, mais également d'approcher les mécanismes d'évolution des structures parmi les Lophotrochozoaires et les Métazoaires de façon plus générale.

L'expression du gène *NK4*, jusque-là associé à la mise en place des tissus cardiaques chez les Vertébrés (Olson, 2006) et la drosophile (Bodmer, 1993), concerne chez *S. officinalis* des structures mésodermiques qui sont surtout des structures dérivées au sein des Mollusques, impliquées dans la locomotion par propulsion : le manteau externe, les

bras et le tube de l'entonnoir. Il semblerait que *NK4* ait été recruté de façon secondaire pour la différenciation de muscles puissants locomoteurs, utiles pour s'échapper en l'absence d'une coquille protectrice. L'émergence de structures musculaires massives se serait donc faite concomitamment à un élargissement important des rôles de ce gène à la mise en place des muscles locomoteurs. Une telle modification d'une structure originelle, l'unique pied des Mollusques, a nécessité d'autres modifications au niveau du contrôle génique.

Dans cette étude, nous décrivons aussi l'expression de *Pax2/5/8* pendant l'embryogenèse de la seiche. Ce gène montre chez *S. officinalis* des expressions mésodermiques. Ceci concorde avec les expressions observées déjà dans le pied des Mollusques étudiés (O'Brien and Degan, 2003). Ces marquages concernent chez *S. officinalis* les structures appartenant à l'hydrostat, mais de façon plus importante, les structures dérivées du pied, les bras et le tube de l'entonnoir. Dans la branche des Mollusques, il y aurait eu une conservation du rôle de *Pax2/5/8* dans le pied. Les expressions de *NK4* et *Pax2/5/8* dans le tube de l'entonnoir, et non dans la poche, suggèrent des origines différentes pour ces deux parties, ne formant qu'un seul et même organe chez l'organisme adulte.

Tandis que la coquille s'internalisait, un mode de locomotion plus adapté était nécessaire à la survie de ces animaux dépourvus d'une protection par une coquille externe. L'émergence des structures appartenant à l'hydrostat a donné un avantage considérable aux Céphalopodes et, plus particulièrement, aux Coléoides : une locomotion rapide par propulsion à réaction permettant un mode de prédation efficace et une fuite rapide. Ceci s'est fait notamment grâce au recrutement de gènes pour de nouvelles fonctions dans les muscles locomoteurs, tel que *NK4*, ou grâce à la conservation des rôles de gènes dans une structure unique, le pied des Mollusques. C'est ce qui a été observé pour *Pax2/5/8* dont les expressions s'étendent parallèlement à la modification de l'unique pied en plusieurs organes participant à la locomotion.

En revanche, *Pax2/5/8* ne montre aucune expression au niveau du SNC, sinon une expression transitoire au niveau des tractus optiques. Il s'agit pourtant d'un gène clé dans la régionalisation du SNC des Vertébrés. Il semblerait que dans ce cas précis, l'émergence du cerveau des Céphalopodes, convergent avec celui des Vertébrés n'ait pas impliqué les mêmes gènes. Cette hypothèse est confirmée par l'absence d'expression de *shh*, un autre gène important dans la mise en place du système nerveux chez d'autres organismes, dans

le SNC pendant le développement de *S. officinalis*. Le cerveau des Céphalopodes est une structure très innovatrice non seulement parmi les Mollusques mais aussi parmi les Lophotrochozoaires. Les processus d'abord de multiplication des ganglions ancestraux puis de regroupement vers l'avant et enfin de coalescence de ces ganglions en un cerveau n'auraient pas exigé les mêmes modifications génétiques que celles intervenues concomitamment à l'émergence du cerveau des Vertébrés. L'apparition de structures analogues n'aurait donc pas encore requis forcément la même « trousse à outils génique » durant l'évolution. Cependant, SHH présenterait des rôles en relation avec la régionalisation du système nerveux chez la seiche, notamment dans la délimitation des ganglions, exprimant *Pax6*, et dans la mise en place de la bilatéralité.

La bilatéralité est un phénomène important à éclaircir dans la branche des Céphalopodes dépourvus de cordon nerveux central. Nous apportons dans cette étude quelques éléments de réponse quant à son mode de mise en place. Grâce à des balnéations en présence d'inhibiteurs, nous montrons que les gènes *shh* et *nodal* seraient bien impliqués dans la régionalisation droite/gauche de la seiche. Ces gènes auraient donc conservé ces fonctions, montrées chez d'autres groupes d'animaux, en dépit de l'absence de cordon nerveux. La zone origine de cette mise en place pourrait se situer le long de l'axe de symétrie bilatérale chez les Céphalopodes, au niveau du manteau, comme suggéré par les HIS du gène *shh*. Les mêmes gènes assureraient par conséquent les mêmes fonctions, mais dans différents contextes développementaux. La question de la perte d'une chaîne nerveuse centrale peut se poser dans la lignée des Céphalopodes. Un scénario possible consiste à penser qu'une série de ganglions alignés ventralement chez l'ancêtre commun des Mollusques se seraient regroupés vers l'avant. La situation du système nerveux des Gastropodes constituerait l'état de transition vers cette cérébralisation poussée. Le groupement des ganglions, devenus véritables lobes de cerveau chez les Céphalopodes, ne se serait pas produit simultanément avec un « déplacement » de l'expression du gène *shh* vers l'avant également. Ce gène aurait conservé une expression de long de l'axe de symétrie. On trouve chez les Céphalopodes des ganglions périphériques spécifiques, les ganglions stellaires, qui se situent latéralement, de part et d'autre de l'axe de symétrie droite/gauche dans le manteau. Nous n'avons pas noté d'indice quant à l'implication de cette structure dans la mise en place du système nerveux en général dans cette étude. Les mécanismes de formation de cette structure restent pourtant un point

essentiel à éclaircir pour avoir une vision plus complète des processus de modifications intervenus dans le système nerveux des Céphalopodes au cours de l'évolution.

Le développement de la locomotion par propulsion à réaction chez les Coléoides a donc exigé des bouleversements non seulement musculaires mais également nerveux. Ces innovations morphologiques ont été accompagnées de modifications dans le contrôle génétique de la mise en place de ces tissus. Si les voies moléculaires n'ont probablement pas été touchées, elles ont pu se mettre en place dans différents contextes structuraux, et même, tissulaires.

La présente étude montre l'intérêt et la pertinence du modèle Céphalopode en Evo – Dévo. S'ils appartiennent à un groupe encore peu étudié, les Lophotrochozoaires, ce fait est loin d'être leur principal atout. Pour constituer un « bon modèle » dans le domaine de l'Evo – Dévo, en plus de remplir les « trous phylogénétiques », le modèle doit également être approprié à l'étude de thèmes clés dans cette discipline. C'est le cas des Céphalopodes qui, par leurs nombreuses innovations morphologiques et structures convergentes, permettent une approche des mécanismes pouvant générer de telles caractéristiques. L'étude des mécanismes ayant conduit à des structures nouvelles dans la branche des Céphalopodes parmi les Mollusques est une fenêtre ouverte sur les mécanismes qui ont rendu possible la diversification à l'échelle plus grande des Métazoaires.

Nous nous sommes attachés ici à l'étude de deux processus impliqués dans la locomotion : d'une part, la spécification et la détermination au niveau nerveux ; d'autre part, la mise en place des tissus musculaires. D'autres systèmes restent encore à étudier, comme le système circulatoire clos, état unique au sein des Mollusques, en relation avec la fonction de locomotion, puisqu'il favorise une meilleure distribution de l'oxygène aux muscles locomoteurs. Les convergences physiologiques entre les systèmes circulatoires des Céphalopodes et des Vertébrés ont déjà été soulignées (Schipp, 1987 ; Wells and Smith, 1987). Certaines expressions de gènes observées pendant l'embryogenèse de *S. officinalis* peuvent être considérées comme des pistes d'étude à même de nous conduire à mieux saisir les mécanismes de la formation de ce système dérivé. Les branchies, par exemple, sont positives pour *Pax6* à des stades précoces et les vaisseaux aux stades tardifs. C'est la première fois qu'une expression de ce gène est observée dans des tissus participant du système circulatoire. *Pax6* a pu être recruté chez les Céphalopodes avec le développement

d'un système circulatoire plus complexe, ceci peut-être en liaison avec le développement musculaire. Il ne s'agit là qu'une des voies de recherche encore inexplorée chez les Céphalopodes. Les mécanismes d'adaptation sur le plan physiologique, et notamment au cours du développement, constituent aussi une perspective importante de recherche dans le cadre d'une étude « Eco-Evo-Dévo ». Les œufs de seiche étant régulièrement découverts au rythme des marées et donc exposés à des variations environnementales majeures, les mécanismes de régulation physiologique seraient cruciaux à caractériser dans le contexte de l'adaptation à l'environnement.

Cette étude présente une approche des mécanismes qui permettent l'émergence de caractères nouveaux dans une lignée. La duplication de gènes et leur sous-fonctionnalisation ultérieure ont joué très certainement un rôle majeur dans la diversification des organismes tels que les Vertébrés. Durant cette étude, nous n'avons pas caractérisé de gènes spécifiques aux Céphalopodes appartenant à quelques-unes des familles géniques particulièrement importantes pendant le développement, notamment les familles *Pax* et *NK*. Par ailleurs, certains gènes caractérisés chez d'autres espèces tels que *Pax1/9* ou *Paxβ*, l'un et l'autre présents chez des Lophotrochozoaires, n'ont pu être caractérisés. Cependant, la diversification par duplication et sous-fonctionnalisation n'exclut pas la perte de certains gènes. Les Vertébrés à mâchoire (Gnathostomes), par exemple, ont perdu le gène *NK7*, qui est présent pourtant chez l'amphioxus (Takatori et al., 2008). La présence de gènes nouveaux dans la lignée des Céphalopodes n'est pas à écarter, puisque la banque ESTs contient des séquences correspondant à des protéines putatives, sans homologue connu chez d'autres espèces. Des gènes propres aux Céphalopodes ont pu intervenir dans la formation de structures spécifiques. Néanmoins, la présente étude montre que d'autres mécanismes peuvent également intervenir dans l'apparition de nouveautés morphologiques. En ce qui concerne les structures dérivées du pied des Mollusques, l'entonnoir et les bras des Céphalopodes, on peut suggérer le scénario suivant : 1/ un premier recrutement, *Pax2/5/8*, pour l'apparition du pied des Mollusques chez les Lophotrochozoaires, 2/ une extension des rôles pré-existant de ce même gène au sein des Céphalopodes dans le même tissu pour la spécialisation du pied en bras et entonnoir, 3/ un second recrutement, *NK4*, toujours pour l'émergence de ces structures. Nous montrons aussi qu'un troisième mécanisme est possible, il s'agit de conservations de fonctions dans des structures ou des caractères analogues (*Pax6*, *shh*, *nodal*) comme la bilatéralité.

Des gènes ayant des rôles très complexes chez les Vertébrés sont aussi présents chez les Spongiaires et les Cnidaires. Des gènes connus pour être de première importance dans la formation et la mise en place du système nerveux chez les Vertébrés ont des homologues chez les Spongiaires qui ne possèdent pas de cellule nerveuse. *PaxB*, par exemple, s'exprime de façon transitoire durant le développement de l'éponge *Amphimedon* (Larroux et al., 2010). Ces gènes ont des rôles ancestraux mais possèdent une forte plasticité. C'est le cas pour les gènes des familles *Pax*, *NK* ou *shh*. Les résultats obtenus chez *S. officinalis* confortent l'idée de l'importance du potentiel évolutif de ces gènes « maîtres » au cours du développement. Si les caractéristiques structurales des gènes étudiés n'ont été que peu remaniées durant l'évolution comme le montre les alignements de séquences notamment, des bouleversements plus importants ont pu porter sur leur mode d'action et leurs rôles, tel que le suggèrent les patterns d'expression de ces gènes pendant le développement de *S. officinalis*. L'originalité de certaines structures des Céphalopodes irait de pair avec des changements dans les voies moléculaires de contrôle et possiblement dans les relations entre les gènes au niveau spatio-temporel. C'est justement cette plasticité génétique extraordinaire qui permet l'émergence et les modifications des structures en réponse à la pression environnementale. Les « switch » ou extension de rôles de gènes chez un groupe aussi dérivé que les Céphalopodes, montrant dans leur lignée un degré de spécificité assez exceptionnel, ouvrent des pistes sur les mécanismes génétiques permettant la diversification des organismes.

Annexe 1

Table de développement embryonnaire de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode), Lemaire, 1970

a. Segmentation

Stade 1

Œuf fécondé insegmenté.

Stade 2

Deux cellules, le premier plan de segmentation est méridien et coïncide avec le plan de symétrie bilatérale du blastoderme

Stade 3

Quatre cellules. Le 2^{ème} plan de segmentation, légèrement oblique par rapport au premier, entraîne une division inégale des cellules du stade 2. Dès le stade 3, la segmentation devient donc inégale mais la symétrie bilatérale persiste.

Stade 4

Huit cellules. Les divisions deviennent inégales et asynchrones.

Stade 5

Seize cellules. Le blastoderme présente deux zones :

- une zone centrale constituée par deux cellules bien délimitées : les blastomères ;
- une zone périphérique constituée par quatorze éléments dépourvus de limite périphérique : les blastocônes. Ce sont eux qui vont former le syncytium vitellin.

Le blastoderme présente encore une symétrie bilatérale bien nette.

Stade 6

Trente-deux cellules : douze blastomères et vingt blastocônes.

Stade 7

Soixante-quatre cellules : trente-six blastomères et vingt-huit blastocônes. La symétrie bilatérale n'est plus apparente.

Stade 8

Morula : segmentation avancée. Les blastomères forment un disque central entouré par les blastocônes.

Stade 9

Blastula : fin de segmentation. Les blastocônes ne sont plus contigus. Ils ont une forme caractéristique en massue.

b. Gastrulation

Stade 10

Début de la gastrulation qui se traduit par l'apparition de l'anneau entomésodermique à la périphérie du blastoderme. A l'extérieur de cet anneau, les noyaux des blastocônes se divisent, formant des files radiales.

Stade 11

Extension de l'anneau entomésodermique. Apparition des noyaux « vitellins » qui se forment à partir des éléments des files radiales.

Stade 12

Le syncytium vitellin commence à recouvrir le vitellus.

Le blastoderme présente 3 zones bien distinctes :

- une région centrale où se formera le sac de la coquille ;
- une région moyenne qui correspond à la mise en place de l'entomésoderme ;
- une région périphérique très étroite : c'est la membrane périvitelline ou syncytium vitellin qui s'est constituée à partir des noyaux vitellins.

Stade 13

Epibolie 1/3. Début de la formation de l'ébauche embryonnaire qui présente une symétrie bilatérale marquée. Dès ce stade, on peut distinguer une aire embryonnaire (régions centrale et moyenne) et une aire extra-embryonnaire (syncytium vitellin).

- une région centrale dont le bord devient plus saillant : c'est le futur sac de la coquille.
- une région périphérique où s'esquisse une différenciation morphologique sous forme d'épaississements symétriques. C'est par le bord externe de cette zone que se fait l'accroissement de l'aire embryonnaire, la zone centrale gardant les mêmes dimensions.

Stade 14

Epibolie 2/3. L'aire embryonnaire s'accroît et poursuit sa différenciation ; l'apparition de certaines ébauches permet d'orienter le futur embryon :

- épaississements ovalaires dorso-latéraux qui formeront les parties latérales de la tête et les yeux ; ce sont les lobes céphaliques de Kölliker ;
- épaississement plus marqué du cercle central à l'origine du manteau ;
- épaississement ventral à l'origine des bras (épaississement brachial).

c. Organogenèse

Stade 15

Stade du bouchon vitellin. Environ 5/6 du vitellus sont recouverts par le syncytium vitellin et l'ectoderme extra-embryonnaire.

L'épaississement correspondant à l'ébauche du manteau, limitant la zone centrale, s'est élargi en forme d'écusson pentagonal dont la pointe est orientée ventralement.

L'épaississement brachial enveloppe maintenant les lobes céphaliques ; les ébauches des bras commencent à s'individualiser. Ebauches paires des bras 5, 4, 3, 2, l'ébauche 3 étant plus discrète, voire absente. Ebauche des branchies pas encore bien nette.

Apparition de l'ébauche oculaire sous forme d'épaississement plus marqué dans la moitié supérieure de chaque lobe céphalique.

Au stade 15, il y a formation d'espaces sanguins au niveau du syncytium vitellin, en continuité avec les lacunes sanguines entourant la masse vitelline dans le sac vitellin externe. Ce système circulatoire primaire est parcouru par les vagues contractiles régulières sur la surface de l'enveloppe vitelline. Les sinus sanguins situés dans l'embryon deviennent différenciés comme une partie du système veineux définitif.

Stade 16

Le sac vitellin externe est définitivement constitué (vitellus + syncytium vitellin + ectoderme extra-embryonnaire).

Une fois le sac vitellin refermé, des vagues péristatiques de contractions se propagent sur le sac vitellin externe et permet le mouvement du sang des lacunes du sac vitellin externe vers les sinus sanguins de l'embryon. Les nutriments produits par le syncytium vitellin passent par les espaces intercellulaires des tissus vers les sinus sanguins.

Invagination du stomodeum et apparition de la bouche. Formation de la vésicule optique primaire par invagination de l'ébauche oculaire.

Ebauches paires des bras 5, 4, 3, 2, l'ébauche 3 étant plus discrète. Ebauches de branchies bien nettes.

Apparition de l'entonnoir sous forme de deux paires d'ébauches bien distinctes et symétriques par rapport à l'axe du blastoderme :

- deux épaississements latéraux correspondent à la base de l'entonnoir et aux muscles rétracteurs du siphon ;
- deux replis ventraux correspondent au tube de l'entonnoir.

Apparition des statocystes sous forme d'épaississements circulaires.

Stade 17

Vésicule optique primaire à demi fermée. Les 10 ébauches des bras sont visibles : les 5,4,2 sont dédoublés ; les 1 et 3 sont encore simples et moins développés. Les ébauches des autres organes s'accroissent.

Stade 18

Vésicule optique primaire fermée. Bouche bien délimitée. Branchies pédiculisées. Bords du manteau plus épaissis et légèrement relevés.

Stade 19

Début de pédiculisation de l'embryon : constriction du sac vitellin au niveau de la couronne brachiale. Fermeture du sac coquillier. Les bords du manteau commencent à se

rabattre sur le blastoderme et à recouvrir les branchies. Les replis du tube de l'entonnoir se sont soudés aux replis correspondant à la base des muscles rétracteurs du siphon. Les 10 ébauches des bras sont paires. Invagination des statocystes. Glandes salivaires visibles au fond du stomodeum.

Stade 20

La séparation entre l'embryon et le sac vitellin externe est plus accusée.

Le sac coquiller est fermé. Les statocystes se sont invaginés mais s'ouvrent encore à l'extérieur. L'ébauche dédoublée des bras commence à s'estomper : les 3 sont encore plus réduits, les 4, plus développés que les autres, correspondent aux futurs tentacules.

Les ébauches du tube de l'entonnoir se sont réunies entre elles sur la ligne médiane.

Ebauche des lobes optiques sous forme de masses proéminentes en arrière de l'œil.

Le manteau continue sa progression et recouvre la base des branchies. Apparition des nageoires.

Stade 21

Les bras 5, 4, 3, 2 sont ramenés ventralement tandis que les bras dorsaux sont situés près de la bouche.

Apparition des replis de l'iris.

Les extrémités antérieures des ébauches du tube de l'entonnoir se sont rapprochées.

Ebauche du cristallin et des ventouses sur les bras.

Différenciation des branchies : 2 à 3 feuillets branchiaux apparaissent sous forme de petits plis transversaux par rapport à l'axe des branchies.

Lobes optiques proéminents en arrière de l'œil.

Stade 22

Soudure des ébauches du tube de l'entonnoir par leur face interne et par leurs extrémités antérieures.

Cristallin sous forme de baguette réfringente.

Le manteau recouvre environ la moitié des branchies.

Longueur dorsale du manteau 0,8 + ou - 0,1 mm.

A partir de ces stades où l'embryon va se redresser et prendre du volume dans le sens antéropostérieur, le sac vitellin va se compresser et former 2 sacs, interne et externe.

Le sac vitellin externe va devenir un organe à part entière comprenant des systèmes respiratoire et circulatoire avec une musculature active bien avant la formation des cœurs.

La surface du sac est recouverte de cils qui permettent une circulation continue du fluide péritellin autour de l'embryon.

Stade 23

Les ébauches antérieures de l'entonnoir ont totalement fusionné pour former le tube siphonal. Les parties postérieures de l'entonnoir (base et muscles du siphon) laissent entre elles une ouverture triangulaire.

Présence de 6 à 7 feuillets branchiaux.

Apparition de l'organe de Hoyle

Longueur dorsale du manteau : 1,1 + ou - 0,1 mm.

Le sac vitellin interne est comprimé et ce qu'il contient est extrudé vers le sac vitellin externe par les organes contractiles de l'embryon.

Stade 24

L'entonnoir est définitivement constitué.

Le bord du manteau recouvre la base de l'entonnoir et la papille anale, laissant découvertes les extrémités des branchies.

Cristallins sphériques. Début de la pigmentation de la rétine en jaune-orangé.

Longueur dorsale du manteau : 1,5 + ou - 0,2 mm.

Le sac vitellin diminue en taille du fait de l'absorption du vitellus (basé sur l'action du syncytium vitellin qui libère le matériel nutritif dans le flux sanguin) et du fait du transfert du vitellus directement dans le sac vitellin interne.

Stade 25

Le manteau a totalement recouvert les branchies et les muscles de l'entonnoir. Rétine orangée.

Apparition de quelques chromatophores jaune-orange sur la face dorsale, au niveau du « col », entre la tête et le manteau.

Longueur dorsale du manteau : 2 + ou - 0,2 mm.

Stade 26

Poche du noir visible sur la face ventrale. Rétine orangée.

Apparition de la cornée secondaire.

Multiplication des chromatophores jaune - orange sur la face dorsale et sur les flancs.

Organe d'Hoyle bien apparent sous forme d'ancre.

Longueur dorsale du manteau : 3 + ou - 0,3 mm.

Stade 27

La cornée secondaire recouvre la moitié de l'œil. Rétine rouge-orangée.

Chromatophores dorsaux plus nombreux et plus foncés (orangés).

Longueur dorsale du manteau : 4 + ou - 0,3mm.

Stade 28

Œil entièrement recouvert par la cornée secondaire. Rétine marron.

Longueur dorsale du manteau : 4,7+ ou - 0,3 mm.

Stade 29

Apparition de la paupière secondaire ventrale et des chromatophores sur la face ventrale.

Chromatophores dorsaux très nombreux et foncés (marrons noirs).

Longueur dorsale du manteau : 5,5 + ou - 0,4 mm

Stade 30

Stade de l'éclosion. Pupilles en W.

Sac vitellin externe totalement résorbé ou presque.

Longueur dorsale du manteau : 7 + ou - 1 mm.

Pax6-R4

←

Pdumerilii	AATCCTTGGTACGCCCAAATGCACCTATGCATGGACTGAGTATGA
Hasinina	-----
Iobsoleta	-----
Euprymna	AATCCCTGGTACGCACCTAACGCCTCTATGGCCGGACTGAGCGCTC
Sepiaoff	AATCCCTGGTACGCACCTAATGCCTCCATGA-----

	355 365 375 385 395

Haliotis asinina (Mollusque, Gastropode), *Ilyanassa obsoleta* (Mollusque, Gastropode)
Pdumeriliis dumerilii (Lophotrochozoaire, Annélide), *Euprymna scolopes* (Mollusque, Céphalopode), *Sepia officinalis* (Mollusque, Céphalopode)

Alignement des séquences protéiques du domaine paired de PAX6

```
Pdumerilii      CDISRILQVSNCGVSKILGRYYETGSIRPRAIGGSKPRVATPEVVNKVAQYKRECPSIFA
Hasinina       CDISRILQVSNCGVSKILGRYYETGSIRPRAIGGSKPRVATNDVVSKIAQFKRECPSI--
Iobsoleta      CDISRILQVSNCGVSKILGRYYETGSIRPRAIGGSKPRVATVDVVARIAQYKRECPSIFA
Euprymnasc     CDISRILQVSNCGVSKILGRYYETGSIRPRAIGGSKPRVATPEVVQKIAQFKRECPSIFA
Sepiaoff      -----SNGCVSKILGRYYETGSIRPRAIGGSKPRVATPEVVQKIAQFKRECPSIFA
                *****:***:***:*****
                ....|. ....|. ....|. ....|. ....|. ....|. ....|. ....|. ....|.
                5      15      25      35      45      55

Pdumerilii     WEIRDRLLESEGVCNQDDIPSVSSINRVLRLNLASETQKTTLSQNPMDKLGFLNGQAWPRT
Hasinina       -----
Iobsoleta      -----
Euprymnasc     WEIRDRLLESEGVCTQDNIPSVSSINRVLRLNLASENQKVLGQGTMYDKLGLLNGQAWPRP
Sepiaoff     WEIRDRLLESEGVCTQDNIPSVSSINRVLRLNLASENQKVLGQGTMYDKLGLLNGQAWPRP
                ....|. ....|. ....|. ....|. ....|. ....|. ....|. ....|. ....|.
                65      75      85      95      105     115

Pdumerilii     NPWYAPNAPMHGLSM
Hasinina       -----
Iobsoleta      -----
Euprymnasc     NPWYAPNASMAGLSA
Sepiaoff     NPWYAPNASM-----
                ....|. ....|. ....|.
                120     125
```

Haliotis asinina (Mollusque, Gastropode), *Ilyanassa obsoleta* (Mollusque, Gastropode)
Pdumeriliis dumerilii (Lophotrochozoaire, Annélide), *Euprymna scolopes* (Mollusque, Céphalopode), *Sepia officinalis* (Mollusque, Céphalopode)

Le groupe IV, *Pax6* et *Pax4*, montre un domaine paired et un homéodomaine mais pas d'octopeptide.

Drosophila CGCCGAGAAAGCCAAACAC-----GTACATCATCACCAGCAGCATCATGTTTCTCAGA
Pdumerilii AGCAGAAAAAGCCAAACACAGCATCAGTCCGCCCTCCAGACAGGCTGCCTCCCCTCCA
Cfornicata AGTGGACGCTGCTCG-----
Sepiaoff ATACCGTAATTCCACCCAAGGTTTACGTATTGATCACAACCTCCAACCTCGAACGGACAGA
*
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
415 425 435 445 455 465

Drosophila GTCTGGGTGGGGGGCATATTGCCACGGAAAGTGTGACAGCAGCACAGGAACAATCGGAG
Pdumerilii GCC-AACCAGCACCCCTCCGCCACCCCGCCGCTGGTTACACAATCATGGGCATCTTAG
Cfornicata -----
Sepiaoff ATTATTGGGTGTATCAACCCGCTTTCAACAATTTTGTTCGAATACCTCAGCAAACGAAA
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
475 485 495 505 515 525

Drosophila AACCGCAGCCACCAACTAGTAATAGCAGTGCTAATTCTGTAAACACAAACGTATCGGCGT
Pdumerilii GGCCCGGTGCTCCCGCCCTCACCGCCGCCGACCCTGCTGGACAGAAGAGAAAGAGAGAGG
Cfornicata -----
Sepiaoff TACCAAAAG-ACTATCAGCCAATTAAGCAGGAAATGCCGTTACCTGGGTC--ATTGGCCT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
535 545 555 565 575 585

Drosophila CGCGAGTGACACGCATCTATTCCAACGTCTGGCACTGATTCTGTCCAAGTTTTCAGTCG
Pdumerilii ATGTGAACGGACATGCTGATGGAGATGTAACGAACAACAACAATGAAAACAGACAAGACC
Cfornicata -----
Sepiaoff CGCCGGGTGGTGGTGGCGTTGAAGTTTCAATTACAGTCCGCCCATGCTCCTGCAACCA
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
595 605 615 625 635 645

Drosophila GTCATATCAATGCCAATAGCAATGAAACCACCCATATAAACTCAACGGCTGAACAAAGAA
Pdumerilii ACAATATCTGGTTCGACCCGTATACGA--AGCTAGCCCGACTTGACGACGAGAACCACGT
Cfornicata -----
Sepiaoff CATAAGTACAAGCCAAATTTATTCAGTTCAACGGTTGGCGTATCACCTCTGGTCCCTC
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
655 665 675 685 695 705

Pax3/7RI

Drosophila CGACTGGATATAGCATAAATGGAATATTAGGAATACAACATGGACACCATTCTC
Pdumerilii CTGGGAGAGGTCTT-----
Cfornicata -----
Sepiaoff CCACTGGCTACAACGGAAGCGTACCAACTAACGAC-----
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
715 725 735 745 755

Platynereis dumerilii (Lophotrochozoaire, Annélide), *Crepidula fornicata* (Mollusque, Gastropode), *Drosophila melanogaster* (Ecdysozoaire, Arthropode), *Sepia officinalis* (Mollusque, Céphalopode)

Drosophila AGTACGCGTTTCAGTACCAAAATCGAGCTGACA--AATTGCAGACACGGTTCGAGTGGCGCAT
Daniorerio AGCA-GCATTTCAGCCGAGC--CAGAGC-AACAGCAACTATATGAACTTTGGCG--TGGGC
Pdumerilii GACA-GAGCCAGGTTCCACCACCAGGGC--ATAAGGGCTTGGTAGTCTATGGTTAATTAAT
Capitella ATCG-AACTTTATTTCCAAAGACCGTTTTTATTGTGCATTCATGTGTCAATGTGTGTGTGT
Euprymna AGCG-GA--TACGTGCAATCACAAATCCATCACGGGATCCGAGCATGGTGAACA-TTGAT
Sepiaoff AGCG-GA--TATGTACAACC-CAGATT-ATCACGGGATTCGAGCATGGTGA AAAATCCAC

*

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1075 1085 1095 1105 1115 1125

Drosophila CGGAACGGCGCTTTACGGCTTACGGGTTACGGACTACTGATTGCCGATTACGGGCTACGA
Daniorerio GATCTGAACAACGTGCAGGCGAGC-TTTCAGAGCAGCAGCGTGCCGAGCCTGCATGGC-A
Pdumerilii TATCGCAATCTCTTATTATCACAAATGACTGTTTTATTCACTTCAAAAATGTTTAGC-A
Capitella GTGTTTGTATGTTGCATTAAGATTATGTTCCAACC-----
Euprymna TTGTCAAATCACATTAAATTGAACATGATTTAA-----
Sepiaoff TTAAATGGGGACAACCTTACAAACCTTTTTTATTTTTTATTTTTTGTGACA-----

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1135 1145 1155 1165 1175 1185

homéodomaine

Euprymna scolopes (Mollusque, Céphalopode), *Sepia officinalis* (Mollusque, Céphalopode), *Pdumeriliis dumerilii* (Lophotrochozoaire, Annélide), *Capitella* sp. (Lophotrochozoaire, Annélide), *Drosophila melanogaster* (Ecdysozoaire, Arthropode), *Danio rerio* (Vertébrés, Téléostéens)


```
Drosophila -----HHGIRAW
Daniorerio NYMNFVGVGDLNNVQASFQSSSVPSLHGIRAW
Pdumerilii -----HQGIRAW
Capitella -----QQGVRTW
Euprymna -----HHGIRAW
Sepiaoff -----YHGIRAW
                        :*:*:*
```

.....|.....|.....|...
355 365

homéodomaine, zone YRD, ↓ : tyrosine conservée

Euprymna scolopes (Mollusque, Céphalopode), *Sepia officinalis* (Mollusque, Céphalopode), *Pdumeriliis dumerilii* (Lophotrochozoaire, Annélide), *Capitella* sp. (Lophotrochozoaire, Annélide), *Drosophila melanogaster* (Ecdysozoaire, Arthropode), *Danio rerio* (Vertébrés, Téléostéens)

Alignement des séquences nucléotidiques partielles de NK2.1

```
Drosophila      ACAACCTTTCTAGTATTCACCACCTCCAAAACCTGCATAGTCAGCATCAAAGTACTTTAT
Daniorerio     -----ATGAGCC
Pdumerilii     -----
Sepiaoff       -----GTGTGCAAACCTGGATGTGAGCGTGGTGCCGCTGGAAAGCATGAGCC
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      5      15      25      35      45      55
                                     NK2F1
                                     ----->

Drosophila      TTAATAGTAATCACTCAACACCCTTTAGCGTGACCGATATCTTAAGTCCAATTGAAGAAT
Daniorerio     TGAGCCCGAAACATAGCACCCCGTTTAGCGTGAGCGATATTCTGAGCCCGATTGAAGAAA
Pdumerilii     -----ATGCTGCTGGATCATCATGATATTCTGAGCCCGATTGAAGAAC
Sepiaoff       TGAGCCCGAAACATACCACCCCGTTTAGCGTGACCGATATTCTGAGCCCGATTGAAGAAA
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      65      75      85      95      105     115
                                     * * *
                                     * * * * * * * * * * * * * * * * *

Drosophila      CGTATCGCAA--CTGGAACCTGAACGGA--AATCCA---CCATC-----TCCGTTTCGATC
Daniorerio     CCTTTAAAAAATTTGCGGCGATGGAAGCAGCGCGAGCCTGGCGAGCCCGCTGTATCGTC
Pdumerilii     ATTATAAAAAAACACCATTGAAGCGAGCATTCCG---CCGCTGGTGCCGGGCTATCGTA
Sepiaoff       CCTATAAAAAAACACCATTGAAGCGAGCATTCCG---CCGCCGAGCTATCGTAACAGCC
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      120     125     135     145     155     165
                                     * * *
                                     * * *
                                     * * *

Drosophila      AACTCTAGTAGCAG-----CAGTATTAATTCCTCTGGAACATTAAC-----
Daniorerio     AG-AGCCAGGTGAGCCAGGCG-AACTGCAGCAGCATAGCATGAGCCATAACG-CGTATC
Pdumerilii     ACCAGCAGAGCGCGACCAGCATGACCAGCATGAGCGGCATGGCGGCGGCGGCGGCGGCA
Sepiaoff       AGCATCCGCAAGCGGCGCGTGCACCGCATGAGCGTGACCGCGCTGCAGCCGCGGAGCA
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      175     185     195     205     215     225
                                     * * *
                                     * * *
                                     * * *

Drosophila      ---TACATCA--ACTATGGCGAATCCGTACGCTAT---GGGAACCTTATATC-ACAGCCC
Daniorerio     ATATGCCGCATAGCCA-GTTTAGCCATAGCACCAT-GGGCGGCTATTGCAACGGCA--CC
Pdumerilii     ACCCGTATCATAACTATGTGCCGAGCTGAGCCATCATAGCACCAGCGGTTTCCGAGCC
Sepiaoff       GCGCGTATCATAACTATGTGCCGCGCTGAGCCATCAT---ACCATT---TTTACCACC
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      235     245     255     265     275     285
                                     ** * * *
                                     * **
                                     * **

Drosophila      AGGTGTACA-----GACCT-----ATTGCGGACCTACCGATAAC----
Daniorerio     ATTGGCGCGATGG--GCGATCT--GCCG---AGCTATCAGGAAAGCATGCGTAACGGCG
Pdumerilii     AGTATTGCAACGGCAGCGATCTGAGCCATTATGGCGATCCGATGAGCATGAGCACCCGTC
Sepiaoff       AGTATTGCAACGGCAGCGATATTGGCCATTATGGCGATGCG-----CGTC
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      295     305     315     325     335     345
                                     * *
                                     * *
                                     * *

Drosophila      ---CTATCTCTGGCTGGT---CACTA-CACTGACATGAGAAATTCTG---CATCGTGG
Daniorerio     CGACCGGACCGCGTGGTATGGCAGCAACCCGGAACCGCGTTAT-----
Pdumerilii     ATAGCAGCGCAGCTGGTATAGCGGAACCCGGATCCGCGTCTGACCATTAGCCGTCGA
Sepiaoff       AGACCACCCCGGGCTGGTATACCACCAACCCGGATCCGCGTTTTACCA---ACTTTGTGC
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      355     365     375     385     395     405
                                     *
                                     * * * * *
                                     * * * * *

Drosophila      TACGGATCAACAGCTAACGACCCAAGATTT----GCAATTCACGCCAATGAGTTCAT
Daniorerio     -----CCGACCATTAGCCGTTTT-----
Pdumerilii     TGGGCCCGAGCAGCTGCAGCATGAGCGGCGTGAGCGGCATGAGCGGC---ATGACCGGCA
Sepiaoff       AGAACTGCCGTAGCTATCCGACCTGGATTGAAGAAGAAGTGAGCCGT---CTGATGGGCA
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
      415     425     435     445     455     465
                                     *
                                     *
```


Drosophila CAAGTCAATCGCAACAGCATGGAACCAATTCGACGTCAGCAG--GCAATAATACCGGTTTC
Daniorerio CCC--GA-CCCGATTTCATCAG-CAGGTGCAGAGCGTGCTG----GGCAGCGAAACCT
Pdumerilii GCGAAGAA-GGCGGCCATCCGGG-CCATAGCAGCGCGGCCATGGCGGCAACCTGGGCGG
Sepiaoff GC---AG-GGCGGCATTCCGGG-CCGTGGCGAAAAACGTCA-----GACCCTGGCGC
* * * *
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
895 905 915 925 935 945

Drosophila AGCAAATAAT-GGAAATGCTAACAGTGAATA--GTTTCTGTAAGTCAAATGTTTCGGG
Daniorerio GCGGAGCGCG--GAAGATCT--GGAAGAAAT--GAGCCCAGCCCCCGCTGATG--GG
Pdumerilii CACCACCGCGGTGTGAGCCCCGCGAGCAAC----GGCCCCGAT--ATGGCGGATA--GC
Sepiaoff TCGTGTGCG-TGAAGAAACCACCCCGAAATTTTCAGAACCCTGC--GCCGAGCATT--GG
* * * * * * * * * *
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
955 965 975 985 995 1005

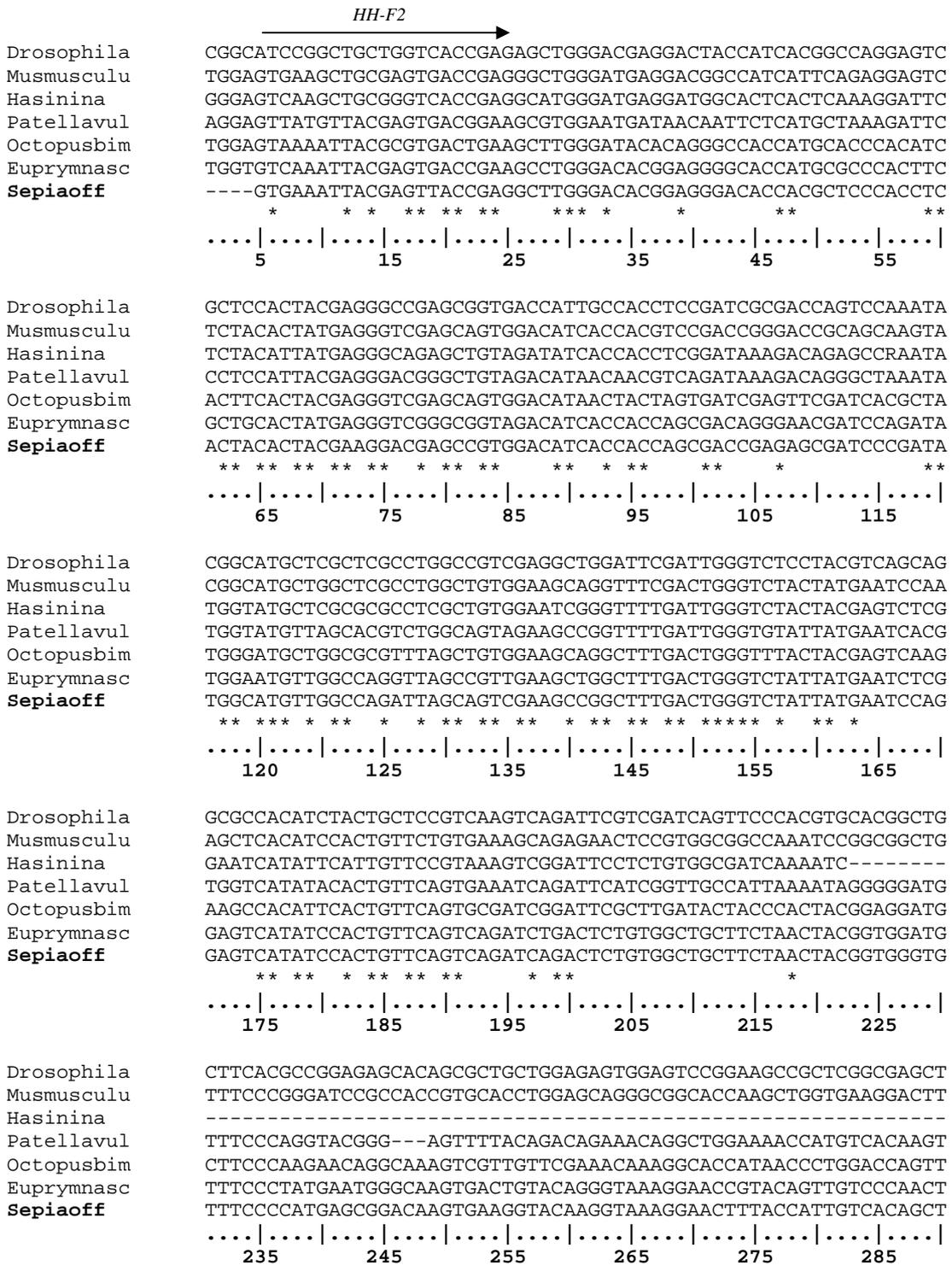
Drosophila TGGTCTCAATCTTATAACAGGAGACGCTCCCAACTCCC-ACTCACCGACACATCTTCAT
Daniorerio CGCCTGAGCC---AGACCGATG-----CGGCGCT--GATTGAATATACCAGCAGCAT
Pdumerilii CCGACCCTGCCG-ATGGCGGGCAGCCGAGCGGCAGCCTGAGCGTGGATAACCAGCCATAG
Sepiaoff CAAACCGAACC-GAAACCG-----CCGAGCGGCGGC--GCGCGTCG-TAACACCCGTTT
* * * * * * * * * *
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1015 1025 1035 1045 1055 1065

Drosophila CTTTACTAGCTAGTTATGGGACTGTTGGAGGTTCTAA
Daniorerio GGTGAGCAGCAAC-----
Pdumerilii CCTG-----
Sepiaoff TCTGAAC-----
*
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
1075 1085 1095 1105

homéodomaine

Pdumeriliis dumerilii (Lophotrochozoaire, Annélide), *Sepia officinalis* (Mollusque, Céphalopode), *Danio rerio* (Vertébrés, téléostéen), *Drosophila melanogaster* (Ecdysozoaire, Arthropode)

Alignement des séquences nucléotidiques partielles de *shh*



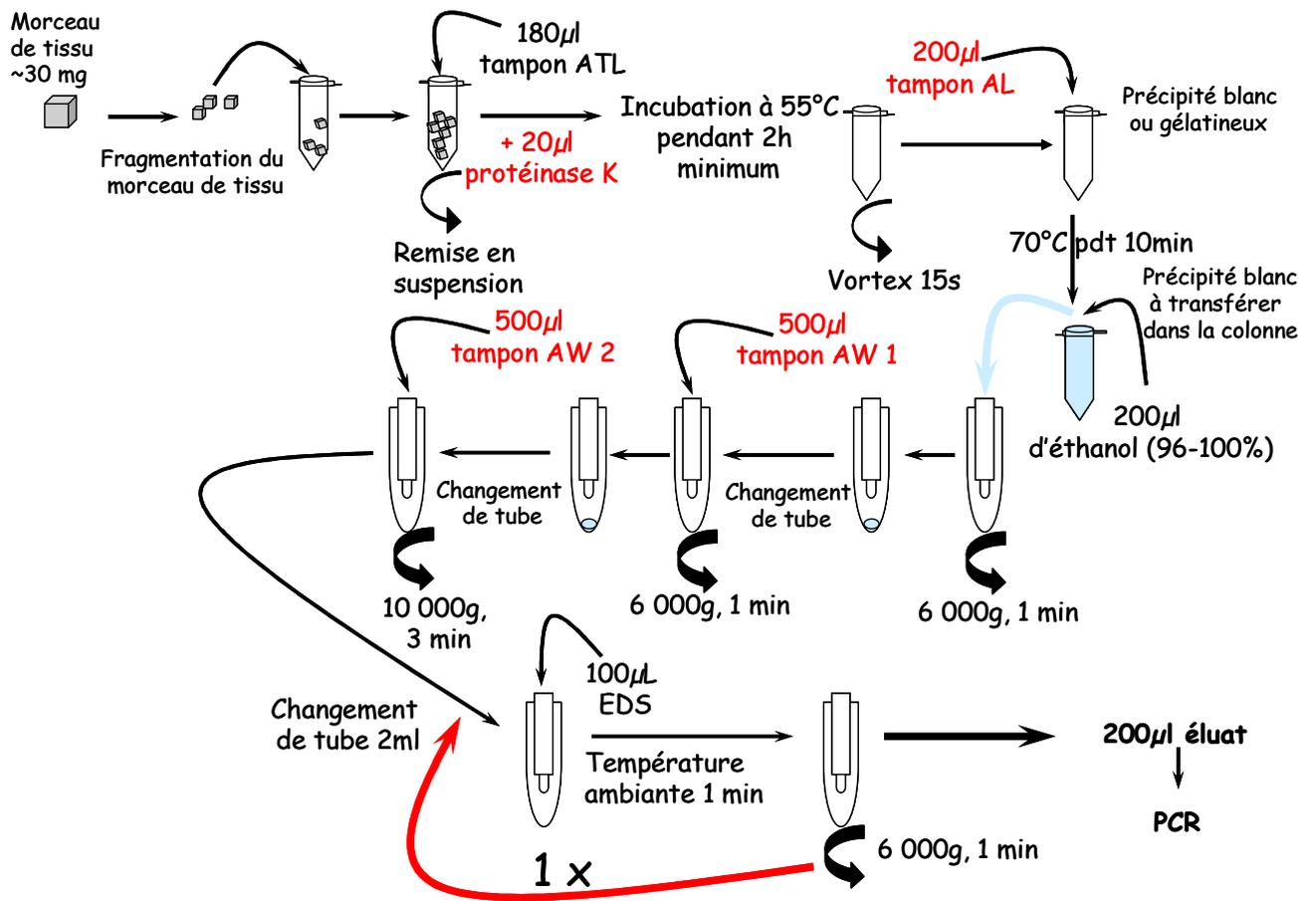
```
Drosophila      CTCTATCGGAGATCGTGT TTTGAGCATGACCGCCAACGGACAGGCCGTCTACAGCGAAGT
Musmusculus    ACGTCCCGGAGACCGCGTGTGGCGGCTGACGACCAGGGCCGGCTGCTGTACAGCGACTT
Hasinina       -----
Patellavul     AGTAGCCGGGGACAGTGT TTTAAGTATGAATAGCAATGGGAAATTAGAATACAGTCCAGT
Octopusbim     AAAAGTTGGTGACAGCGT TTTATCGGTCGACCTTCAAGGCGAGTTAACTTACAGTGAAGT
Euprymnasc     AAAGGTAGGGGACGAAGT CTTTGCCTTGAATCCAGGGAAAATTGGTTTACAGCGAAGT
Sepiaoff      AAATGTAGGAGATGAGGT TCTTTCAATGAATGCCGACGGCAAATGGTTTACAGCGAAGT
               ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
               295      305      315      325      335      345
Drosophila      GATCCTCTTCATGGACCGCAACCTCGAGCAGATGCAAAACTT-TGTGCAGCTGC-ACACG
Musmusculus    CCTCACCTTCCCTGGACCGCGACGAAGGCGCCAAGAAGGTCTTCTACGTGATCGAGACGCT
Hasinina       -----
Patellavul     TATAGCGTTTATAGACAGAAATGAACGGGAGTTGGAACGGTATATCACTCTTC--ATACG
Octopusbim     GATAGCATTTTTGGACACCAATAAGGATTCTAGTGGTACTTTTACC GAATTG--AAACA
Euprymnasc     CATCGCTTTCCCTTGACATCAAGAACGATACCAGCGGTCATTTCTATGTGCTTG--AGACA
Sepiaoff      CATCGCCTTCCCTCGACATAAAGAATGATACCAGTGGCCATTTTTTACAGATTG--AAACT
               ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
               355      365      375      385      395      405
Drosophila      GACGGTGGAGCAGTGCTCACGG-TGACGCCGGCTCACCTGGTTAGCGTTT-----
Musmusculus    GGAGCCGCGCGAGCGCCTGCTGCTCACCGCCGCGCACCTGCTCTTCGTGGCGCCGCACAA
Hasinina       -----
Patellavul     GAAGATAAAAAAGACATT-ACGTTAACATCTAAACACCTCATTTACATGTGACATCAAA
Octopusbim     GAGAACGGCCATAACAATT-CGACTGACCGGAAAGCACTTAATTTATTCCTCTTACACAAA
Euprymnasc     GAAAATGGTCACAAGGTT-CACCTGACCGGCAAACACCTCATCTACACTTCCGAAACAAA
Sepiaoff      GAAAGTGGTCACGAGGTA-CATCTGACCGGCAAACATCTCATCTACTCTTCCGATACGAA
               ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
               415      425      435      445      455      465
                                     HH-R3
                                     ←-----
Drosophila      -----
Musmusculus    CGACTCGGGGCCACGCC--GGGCCAAGCGCGCTCTTTGCCAGCC
Hasinina       -----
Patellavul     CGTCACAACCGATGACGTAACAGACTCTTTAATGTGGTGTATGCC
Octopusbim     TCGAACACGGTTTGACCTG--AATGACAATGATTCTGAGTTTCGAA
Euprymnasc     TCGGACCTCATTCGTGCTT---GACTCTGCAAGTTCCCGATTTCGAA
Sepiaoff      CCGGACCTCTTTTGTCTC---GACTCTGTAGATTCTCGATT---
               ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
               475      485      495      505      515
```

Haliotis asinina (Mollusque, Gastropode), *Patella vulgata* (Mollusque, Gastropode),
Octopus bimaculoides (Mollusque, Céphalopode), *Euprymna scolopes* (Mollusque,
Céphalopode), *Sepia officinalis* (Mollusque, Céphalopode)

Annexe 3

Protocole d'extraction d'ADN

Technique QIAgen Kit DNeasy Tissue®



Annexe 4

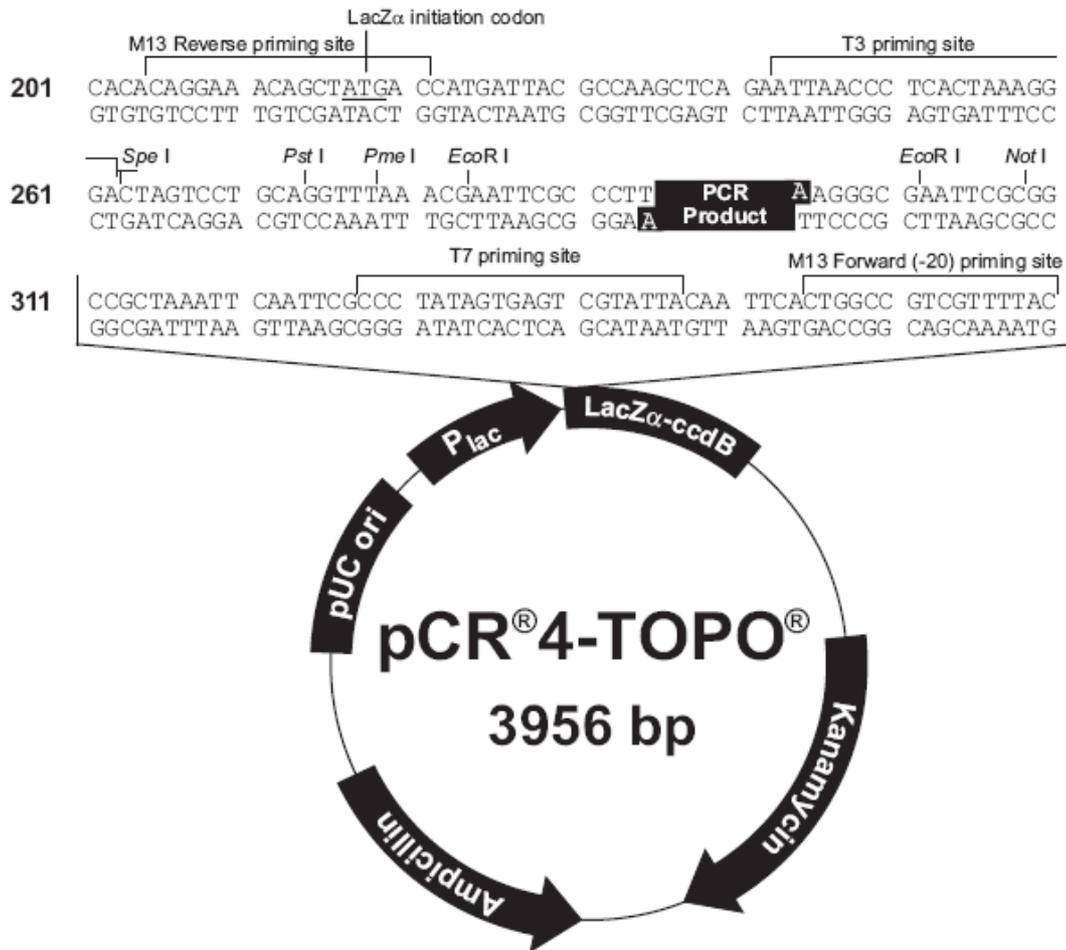
Protocole d'extraction d'ARN

Extraction des ARN au Tri Reagent®

1. Suspendre le tissu dans du **Tri Reagent®** : **1 mL de Tri Reagent pour 50 à 100 mg**
2. Incuber **5 min à T ambiante**.
3. Ajouter **0.2 mL de chloroforme** par **mL de Tri Reagent** Agiter vigoureusement par inversion pendant **15 sec**
4. Incuber à **T ambiante 2 à 15 min**
5. Centrifuger **12000rpm 15 min 4 °C (programme 17)**
On obtient 2 phases :
 - en haut translucide : *ARN (environ 0.6 mL)*
 - en bas rouge : *phénol chloroforme*
 - anneau d'interface : *ADN protéines (peut être récupéré pour une autre manip)*
6. Récupérer la phase aqueuse dans un nouveau tube sans prélever l'anneau de l'interface.
7. Rajouter **0.5 mL d'isopropanol** par **mL de Tri Reagent**
8. Incuber **10 min à température ambiante**
9. Centrifuger **12000rpm 15 min 4 °C (programme 17)** : *L'ARN précipite en culot*
10. Enlever le surnageant
11. Laver le culot avec **1 mL d'éthanol 75%** par **mL de Tri Reagent**
12. Centrifuger **10000rpm 10 min 4 °C (programme 18)**
13. Enlever le surnageant par inversion et laisser sécher sous la hotte (ne pas dessécher le culot)
14. Reprendre le culot dans **20 à 40 µL d'eau DEPC**
15. Incuber **10 min à 55 à 60 °C**
16. Congeler à **- 80 °C**
17. Diluer l'ARN dans **60 µL d'eau DEPC** pour faire la lecture de densité optique à 260 nm

Annexe 5

Carte du plasmide pCR® 4-TOPO® (Invitrogen) utilisé lors des clonages de séquences PCR



Le plasmide possède un gène de résistance à la **kanamycine** et un gène de résistance à l'**ampicilline**, utilisé pour la sélection des clones.

pUC ori désigne l'origine de répllication du plasmide.

P_{lac} est le promoteur du gène LacZ codant pour la β -galactosidase.

Les sites « **M13 reverse** » et « **M13 forward** » encadrant le site de ligation du produit PCR sont reconnus par des amorces correspondantes fournies dans le kit permettant une PCR test.

T3 et **T7** « priming sites » correspondent aux sites d'hybridation entre l'ARN et la polymérase T3 ou T7 utilisées pour la synthèse de sonde.

Annexe 6

Protocole de synthèse de sonde

Kit de transcription Roche ®

Mix

Plasmide linéaire (au moins insert + site)	7 µl
Mix U	2 µl (1 DigUTP+ 1 UTP)
Mix ACG GTP)	6 µl (2 ATP +2 CTP + 2
Tp 10x	2 µl
Rnase inhibitor	1 µl
RNA polymérase (sp6, T7 ou T3... selon plasmide)	2 µl
Volume final	20 µl

- Mélanger doucement, centrifuger brièvement si nécessaire
 - Incuber ON à 37°C (2h au minimum)
 - Ajouter 2 µl de DNase I, incuber 30 min à 37 °C
 - Stopper la réaction avec 2 µl EDTA 0,2M pH 8
-
- Faire migrer 2 µl de sonde et 2 µl de bleu sur un gel agarose à 1% → Bande de la taille attendue présente
- Précipitation au chlorure de lithium (cf. protocole en annexe 3)
- Reprendre le culot dans 100µl d'eau MiliQ® (Eurobio)
- Lecture des rapports de densité optique et calcul de la concentration

Annexe 7

Solutions utilisées pour les HIS *in toto*

PBS 10X

KCl	0,5g
KH ₂ PO ₄	0,5g
NaCl	20g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	2,87g
qsp H ₂ O	250ml

Autoclaver

SSC 20X

Citrate de Sodium 3M	
88,2g	
NaCl 3M	
175,3g	
H ₂ O	
800ml	
NaOH jusque pH 7	
qsp H ₂ O	1L
Autoclaver	

SDS 20%

10g dans 50ml H₂O

PTW

PBS 1X	100ml
Tween 0,1%	100µl

SH

Formamide	50%	35ml
SSC 20X	5X	17,5ml
Tween 20 10%	0,1%	700µl
SDS 20%	1%	1,75ml
qsp H ₂ O (15,05ml)		70ml

BS = Buffer pour blocking solution

MABT

Maleic acid	100mM
5,8g	

NaCl	150mM, pH 7,5	4,35g
NaOH		3,5g
Tween		5,5ml
qsp H ₂ O		500ml

BB 10%

blocking powder 2g dans 20ml AP buffer, chauffer au micro-onde pour dissoudre

Aliquoté la solution non utilisée et Stocké à -20°C

AP buffer (Tampon phosphatase alcaline)

Respecter l'ordre

Tris pH9.5	100mM	12,1g
NaCl	100mM	5,85g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	50mM	4,76g
qsp H ₂ O		1L
Tween 20	0,1%	1ml

RNase buffer

NaCl	500mM	29,25g
Tris HCl pH 8	10mM	1,57g
EDTA	1mM	0,37g
qsp H ₂ O		1L

RNase A solution

RNase A	20mg
Acetate Na 0,01M, pH 5,2	2ml

Chauffer à 100°C pdt 15min, laisser refroidir

Ajout 0,1 volume (200µl) Tris HCL1M, pH 7,4

Aliquoté en 250µl. Stocké à -20°C

H₂O DEPC (diethylpyrocarbonate) 0,1%

H₂O 500ml

DEPC 500µl

Au moins une nuit à 37°C

Autoclaver 45min

Levamisol 100mM 24mg/ml H₂O

Aliquoté en 180µl. Stocké à -80°C

Héparine 5mg/ml de SSC 4X

Aliquoté en 500µl. Stocké à -20°C.

tRNA 100mg/ml d'H₂O

Ajouter directement 1ml d'H₂O dans le flacon d'origine

Aliquoté en 50µl. Stocké à -20°C.

FBS

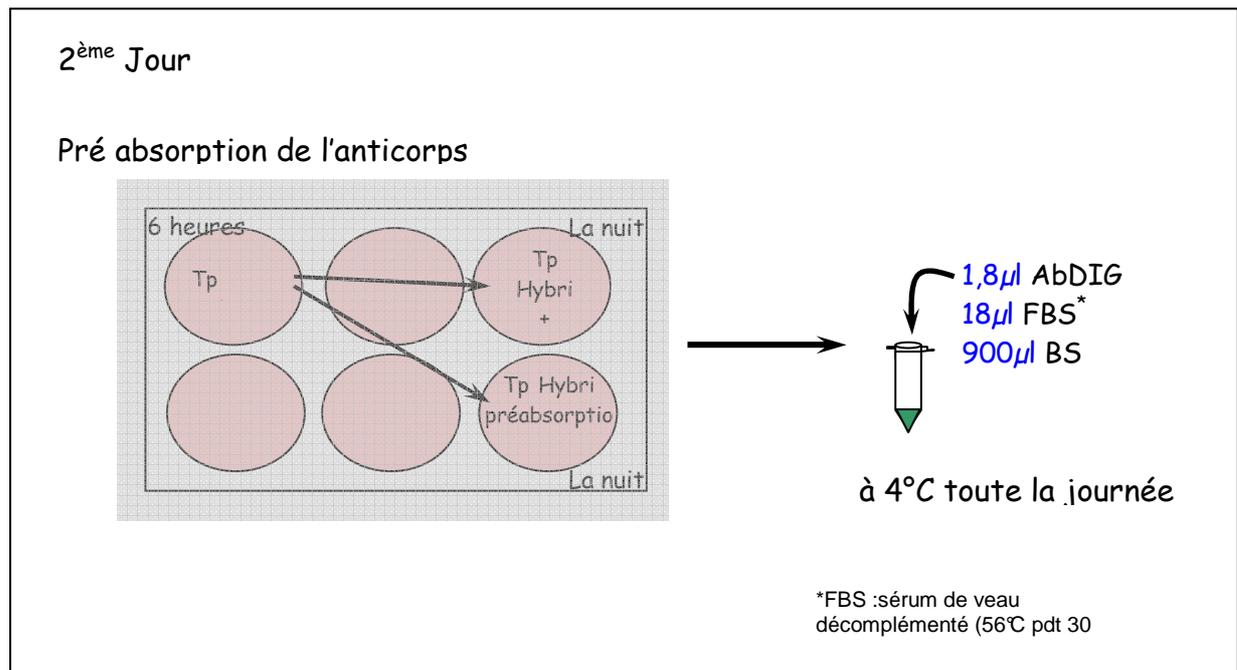
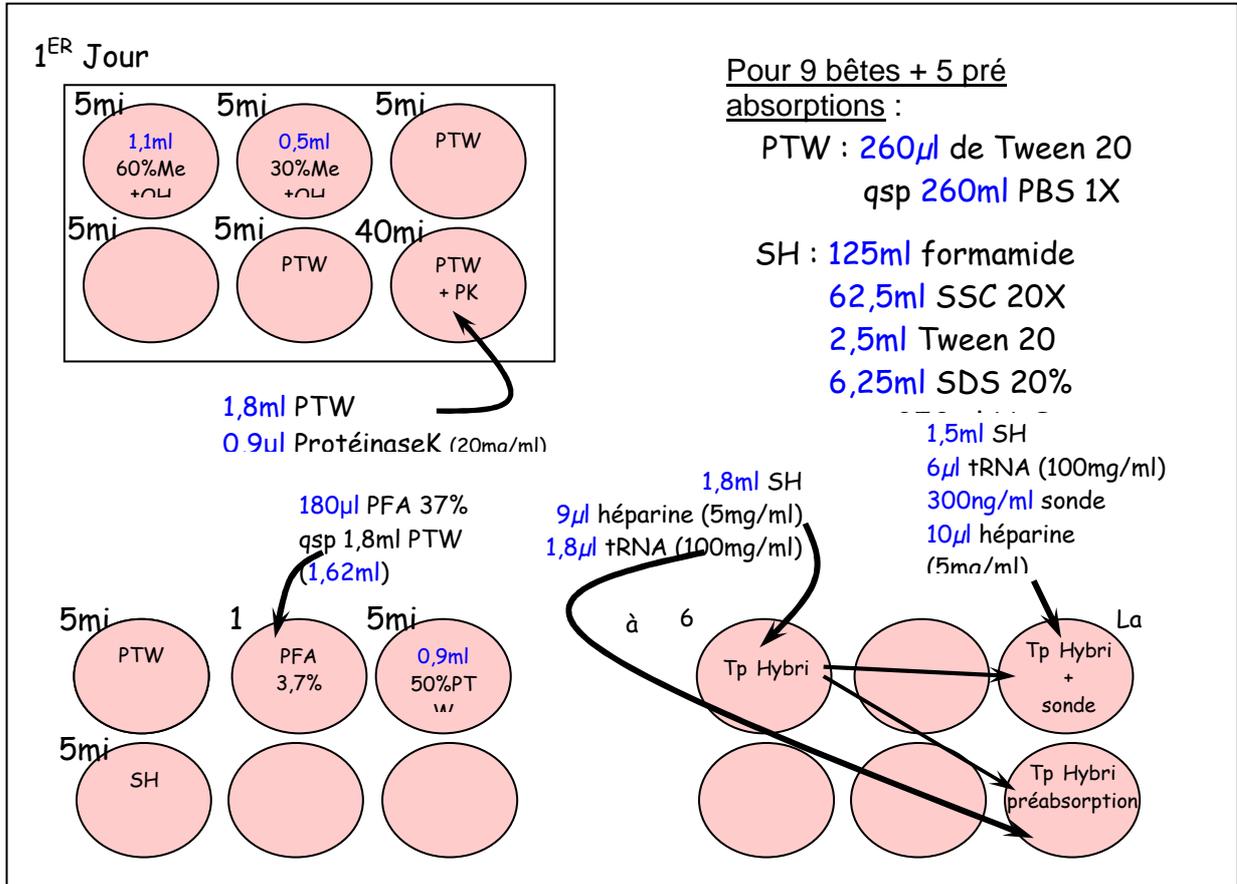
A décomplémenter

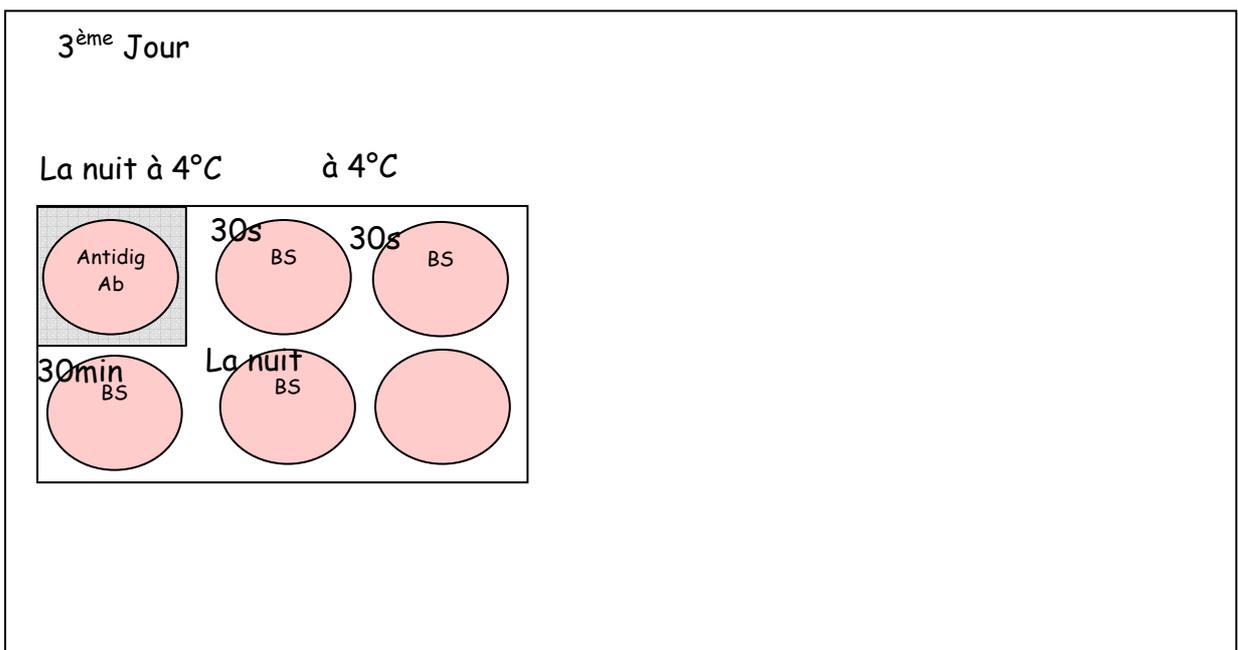
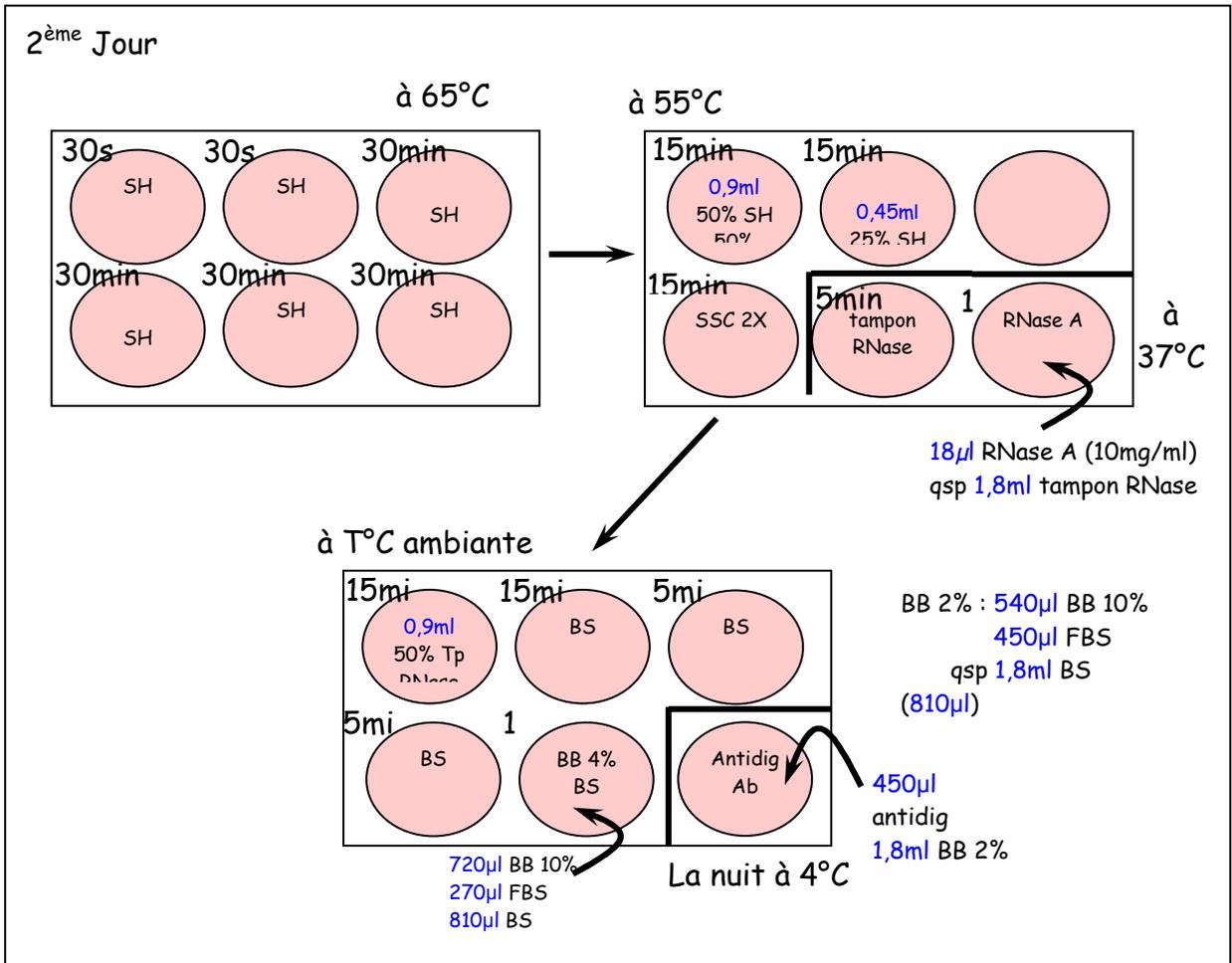
Décongeler puis 30 min à 56°C (bain-marie)

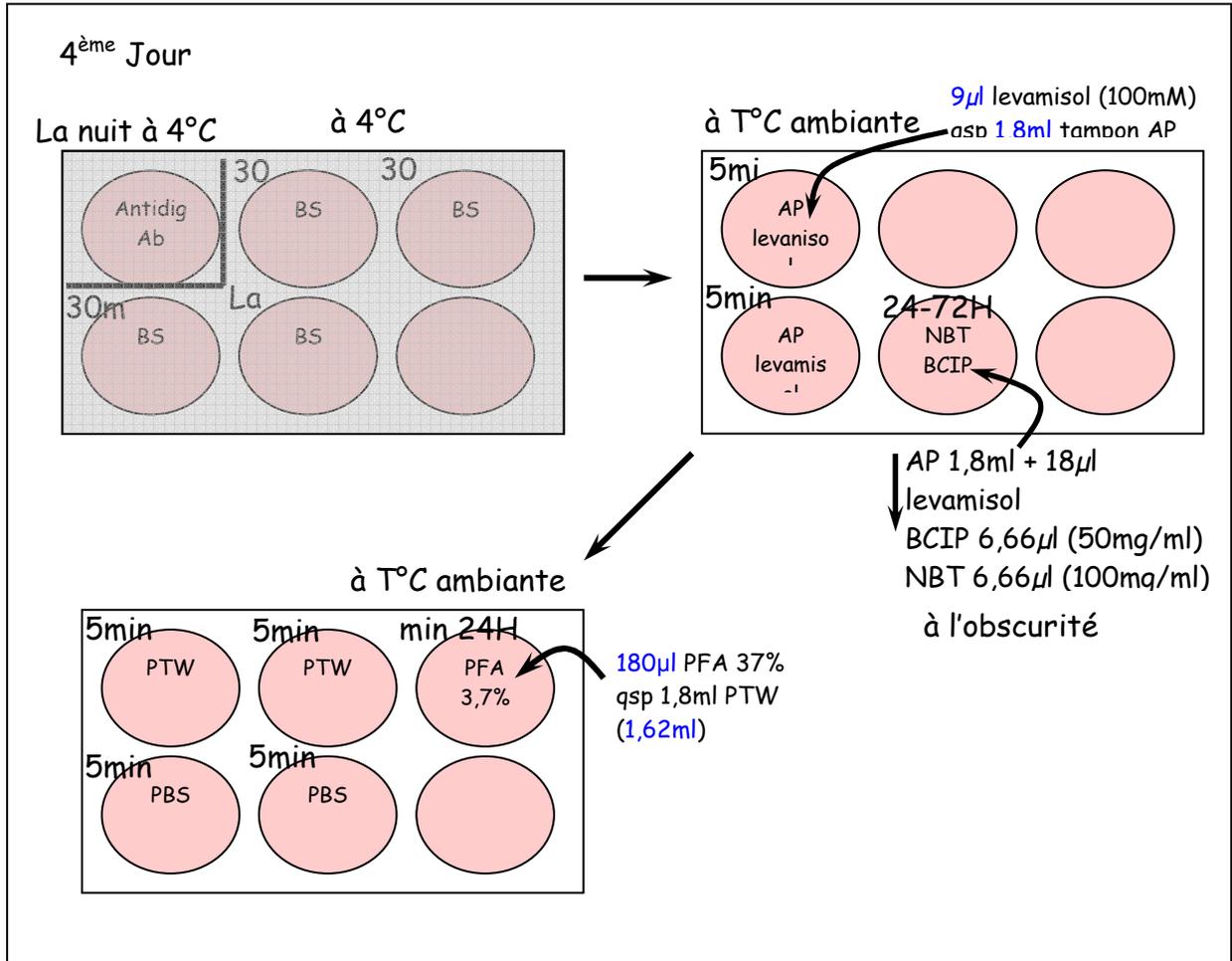
Aliquoté en 1,8 ml

Annexe 8

Protocole d'HIS *in toto*







Bibliographie

A

Agin V, Dickel L, Chichery MP, Chichery R, 1998. Evidence for a specific short-term memory in the cuttlefish, *Sepia*. Behavioural Processes, 43, 329-334.

Agin V, Chichery R, Dickel L, Chichery MP, 2006. The "prawn-in-the-tube" procedure in the cuttlefish: habituation or passive avoidance learning ? Learn Mem 13, 97-101.

Aitken JP, O'Dor RK, Jackson GD, 2005. The secret life of the giant Australian cuttlefish *Sepia apama* (Cephalopoda): Behaviour and energetics in nature revealed through radio acoustic positioning and telemetry (RAPT). J exp mar boil eco 320, 77-91.

Akazawa H, Komuro I, 2005. Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases. Pharmacol Ther 107, 252-268.

Arendt D, Nübler-Jung K, 1994. Inversion of dorsoventral axis ? Nature 371, 6492-6526.

B

Bae YK, Shimizu T, Muraoka O, Yabe T, Hirata T, Nojima H, Hirano T, Hibi M, 2004. Expression of *sax1/nkx1.2* and *sax2/nkx1.1* in zebrafish. Gene Exp. Patterns 4, 481-486.

Balczarek KA, Lai ZC, Kumar S, 1997. Evolution of functional diversification of the paired box (*Pax*) DNA-binding domains. Mol Biol Evol 14, 829-842.

Ballowitz E, 1892. Über den feineren Bau der Muskelsubstanzen. 1. Muskelfaser der Cephalopoden. Arch mikr Anat 29, 291-324.

Bally-Cuif L, 2000. Les Gènes du développement. Ed. Dunod, coll. Masson Sciences, Paris.

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.

Barth KA, Wilson Sw, 1995. Expression of zebrafish *nk2.2* is influenced by *sonic hedgehog*/vertebrate *hedgehog-1* and demarcates a zone of neuronal differentiation in the embryonic forebrain. Development 121, 1755-1768.

Bassham S, Cañestro C, Postlethwait JH, 2008. Evolution of developmental roles of *Pax2/5/8* paralogs after independent duplication in urochordate and vertebrate lineages. BMC Biol 22, 6-35.

- Baumer N, Marquardt T, Stoykova A, Spieler D, Treichel D, Ashery-Padan R, Gruss P. 2003. Retinal pigmented epithelium determination requires the redundant activities of Pax2 and Pax6. *Development* 130, 2903–2915.
- Bhagavati S, Song X, Siddiqui MA, 2007. RNAi inhibition of *Pax3/7* expression leads to markedly decreased expression of muscle determination genes. *Mol Cell Biochem* 302, 257-262.
- Blackshaw SE, Nicholls JG, 1995. Neurobiology and development of the leech. *J Neurobiol* 27, 267-276.
- Blanc A, Pinczon du Sel G, Daguzan J, 1998. Habitat and diet of early stages of *Sepia officinalis* L. (Cephalopoda) in Morbihan bay, France. *J Moll Stud*, 64, 263-274
- Bodmer R, 1993. The gene *tinman* is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Development* 118, 719-729.
- Bodmer R, Jan LY, Jan YN, 1990. A new homeobox-containing gene, *msh-2*, is transiently expressed early during mesoderm formation of *Drosophila*. *Development* 110, 661-669.
- Boletzky Sv, 1987. Ontogenetic and phylogenetic aspects of the cephalopod circulatory system. *Experientia* 43, 478-483.
- Boletzky Sv, 1988a. Cephalopod development and evolutionary concepts. In: *Paleontology and neontology of cephalopods*, vol. 12. Ed. M. R. Clarke and E. R. Trueman, pp. 185-202, San Diego.
- Boletzky Sv, 1988b. Characteristics of Cephalopod embryogenesis. In: *Cephalopods - Present and Past*. Ed. J. Wiedmann and J. Kullmann, pp. 167-179, Stuttgart.
- Boletzky Sv, 1993. The arm crown in cephalopod development and evolution. *Am malacol Bull*, 10, 61-69.
- Boletzky Sv 2006. The *Sepia* egg: a showcase of cephalopod embryology. *Vie et Milieu - Life & Environment* 56, 191-201.
- Bopp D, Jamet E, Baumgartner S, Burri M, Noll M, 1989. Isolation of two tissue-specific *Drosophila* paired box genes, *Pox meso* and *Pox neuro*. *EMBO J* 8, 3447-3457.
- Boycott BB, 1961. The functional organization of the brain of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Proc R Soc B* 153, 503-534.
- Boyle P, Froesch D, 1979. The peripheral fields of *Octopus* stellar nerves. *Mar Behav Physiol* 6, 25-31.
- Bradley EA, Young JZ, 1975. Comparison of visual and tactile learning in octopus after lesions to one of the two memory systems. *J Neurosci Res* 1, 185-205.

Brand T, 2003. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol* 258, 1-19.

Briscoe J, Sussel L, Serup P, Hartigan-O'Connor D, Jessell TM, Rubenstein JL, Ericson J, 1999. Homeobox gene *Nkx2.2* and specification of neuronal identity by graded *Sonic hedgehog* signaling. *Nature* 398, 622-627.

Briscoe J, Chen Y, Jessell TM, Struhl G, 2001. A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell* 7, 1279–1291.

Bruneau BG, 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, Relaix F, 2007. The role of *Pax* genes in the development of tissues and organs: *Pax3* and *Pax7* regulate muscle progenitor cell functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 645-673.

Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S, 2005. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 6, 826-835.

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, 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 BU, 1994. Cephalopod sense organs, nerves and the brain: adaptations for high performance and life style. *Mar Freshwater Behav Phys*, 25, 13-33.

Budelmann BU, 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 BU, 1997. Cephalopoda. In: Microscopic anatomy of invertebrates, vol. 6A, Mollusca, part II. Ed. Harrison W. and Kohn A.), pp. 119-414, New-York: Wiley-Liss.

Bürglin TR, Kuwabara PE, 2006. Homologs of the Hh signalling network in *C. elegans*. *WormBook* 28, 1-14. .

C

Callaerts P, Halder G, Gehring WJ, 1997. *Pax6* in development and evolution. *Annu Rev Neurosci* 20, 483-532.

Camus A, Davidson BP, Billiards S, Khoo P, Rivera-Pérez JA, Wakamiya M, Behringer RR, Tam PP, 2000. The morphogenetic role of midline mesendoderm and ectoderm in the development of the forebrain and the midbrain of the mouse embryo. *Development* 127, 1799-1813.

Chamberlain JA, 1990. Jet propulsion of *Nautilus*: a surviving example of early Paleozoic cephalopod locomotor design *Can J Zool* 68, 806-814.

Charron F, Stein E, Jeong J, McMahon AP, Tessier-Lavigne M, 2003. The morphogenetic sonic *hedgehog* is an axonal chemoattractant that collaborates with *netrin-1* in midline axon guidance. *Cell* 113, 11-23.

Cheesman SE, Layden MJ, Von Ohlen T, Doe CQ, Eisen JS, 2004. Zebrafish and fly Nkx6 proteins have similar CNS expression patterns and regulate motoneuron formation. *Dev* 131, 5221-5232.

Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA, 2002. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev* 16, 2743-2748.

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.

Clarke GM, 1998. Developmental stability and fitness: the evidence is not quite so clear. *Am Nat* 152, 762-766.

Coolen M, Menuet A, Mazan S, 2009. Towards a synthetic view of axis specification mechanisms in vertebrates: insights from the dogfish. *C R Biol* 332, 210-218.

Cooper MK, Porter JA, Young KE, Beachy PA, 1998. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science* 280, 1603-1607.

Cordes SP, 2005. Molecular genetics of the early development of hindbrain serotonergic neurons. *Clin Genet* 68, 487-494.

Cripps RM, Olson EN, 2002. Control of cardiac development by an evolutionarily conserved transcriptional network. *Developmental Biology* 246, 14-28.

Czerny T, Bouchard M, Kozmik Z, Busslinger M, 1997. The characterization of novel *Pax* genes of the sea urchin and *Drosophila* reveal an ancient evolutionary origin of the Pax2/5/8 subfamily. *Mech Dev* 67, 179-192.

D

Dahn RD, Davis MC, Pappano WN, Shubin NH, 2007. *Sonic hedgehog* function in chondrichthyan fins and the evolution of appendage patterning. *Nature* 445, 311-314.

Dale JK, Vesque C, Lints TJ, Sampath TK, Furley A, Dodd J, Placzek M, 1997. Cooperation of BMP7 and SHH in the induction of forebrain ventral midline cells by prechordal mesoderm. *Cell* 90, 257-269.

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.

Dickel L, Chichery MP, 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 MP, 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.

Dohrn A, 1875. The origin of vertebrates and the principle of functional changes. *Theory Biosci* 125, 181-241.

Drummond I, 2003. Making a zebrafish kidney: a tale of two tubes. *Trends Cell Biol* 13, 357-365.

Duboc V, Röttinger E, Lapraz F, 2002. Left-Right asymmetry in the sea urchin embryo is regulated by Nodal signaling on the right side. *Dev Cell* 9, 147-158.

E

Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP, 1993. *Sonic hedgehog*, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-1430.

Elliott DA, Solloway MJ, Wise N, Bibenn C, Costa MW, Furtado MB, Lange M, Dunwoodie S, Harvey RP, 2006. A tyrosine-rich domain within homeodomain transcription factor *Nkx2-5* is an essential element in the early cardiac transcriptional regulatory machinery. *Development* 133, 1311-22.

Emerson CP Jr, 1993. Embryonic signals for skeletal myogenesis: arriving at the beginning. *Curr Opin Cell Biol* 5, 1057-1064.

Ericson J, Rashbass P, Schedl A, Brenner-Morton S, Kawakami A, van Heyningen V, Jessell TM, Briscoe J, 1997. *Pax6* controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded *Shh* signaling. *Cell* 90, 169-180.

Ericson J, Briscoe J, Rashbass P, van Heyningen V, Jessell TM, 1997. Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62, 451-466.

Ertzer R, Müller F, Hadzhiev Y, Rathnam S, Fischer N, Rastegar S, Strähle U, 2007. Cooperation of *sonic hedgehog* enhancers in midline expression. *Dev Biol* 301, 578-589.

F

Favor J, Sandulache R, Neuhäuser-Klaus A, Pretsch W, Chatterjee B, Senft E, Wurst W, Blanquet V, Grimes P, Spörle R, Schughart K, 1996. The mouse *Pax2* (1Neu) mutation is identical to a human *PAX2* mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in developmental defects of the brain, ear, eye, and kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 13870-13875.

Feng X, Adiarte EG, Devoto SH, 2000. *Hedgehog* acts directly on the zebrafish dermomyotome to promote myogenic differentiation. *Dev Biol* 300, 736-746.

Frösch D, 1971. Quantitative Untersuchungen am Zentralnervensystem der Schlüpfstadien von zehn mediterranen Cephalopodenarten. *Rev Suisse Zool* 78, 1069-1122.

G

Garcia-Fernandez J, 2005. The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nature Rev genetics* 6, 881-892.

Gehring WJ, Ikeo K, 2008. *Pax6*, mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet* 15, 371-377.

Gehring WJ, Affolter M, Bürglin TR, 1994. Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem*, 63, 487-526.

Gonzalez-Santander R, Socastro Garcia-Blanco E, 1972. Ultrastructure of the obliquely striated or pseudostriated muscle fibres of the cephalopods: *Sepia*, *Octopus* and *Eledone*. *J Submicr Cytol* 4, 233-245.

Goulding MD, Chalepakis G, Deutsch U, Erselius JR, Gruss P, 1991. Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J* 10, 1135-1147.

Goulding M, Paquette A, 1994. *Pax* genes and neural tube defects in the mouse. *Ciba Found Symp* 181, 103-113.

Grande C, Patel NH, 2009. Nodal signaling is involved in left-right asymmetry in snails. *Nature* 457, 1007-1011.

Grassé P.P., 1989. *Traité de Zoologie/Céphalopodes*. Ed. Masson, Paris. F.

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

Grimaldi A, Tettamanti G, Brivio MF, 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 MF, 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.

Grimaldi A, Tettamanti G, Acquati F, Bossi E, Guidali ML, Banfi S, Monti L, Valvassori R, de Eguileor M, 2008. A *hedgehog* homolog is involved in muscle formation and organization of *Sepia officinalis* mantle. *Dev Dyn* 237, 659-671.

Gröger H, Callaerts P, Gehring WJ, Schmid V, 2000. Characterization and expression analysis of an ancestor-type *Pax* gene in the hydrozoan jellyfish *Podocoryne carnea*. *Mech Dev* 94, 157-69.

Gutjahr T, Patel NH, Li X, Goodman CS, Noll M, 1993. Analysis of the gooseberry locus in *Drosophila* embryos: gooseberry determines the cuticular pattern and activates gooseberry neuro. *Development* 118, 21-31.

H

Hamada H, Meno C, Watanabe D, Saijoh Y, 2002. Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat Rev Genet* 3, 103–113.

Hammond R, Blaess S, Abeliovich A, 2009. Sonic hedgehog is a chemoattractant for midbrain dopaminergic axons. *PLoS One* 4, 7007.

Hanson J, 1973. Evidence from electron microscope studies on actin paracrystals concerning the origin of the cross-striation in the thin filaments of vertebrate skeletal muscle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 183, 39-58.

Hartmann B, Lee PN, Kang YY, Tomarev S, de Couet HG, 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.

Harvey RP, 1996. *NK-2* homeobox genes and heart development. *Dev Biol* 178, 203-216.

Hejnol A, 2010. Expanding the species-list for Evo-Devo studies. The case of the brachiopod *Terebratalia transversa*. 3^{ème} Conférence Européenne de Biologie Evolutive Développementale (Euro-Evo-Devo), Université Paris Diderot - Paris 7, France.

Heller N, Brändli AW, 1999. *Xenopus Pax-2/5/8* orthologues: novel insights into *Pax* gene evolution and identification of *Pax-8* as the earliest marker for otic and pronephric cell lineages. *Dev Genet* 24, 208-219.

Hochner B, Brown ER, 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 CH, 1987. The nautiloid cephalopods: a strange success. *J Geol Soc* 144, 1–15.

Holland LZ, 2002. Heads or tails ? Amphioxus and the evolution of anterior-posterior patterning in deuterostomes. *Dev Biol* 241, 209-228.

Holland ND, Venkatesh TV, Holland LZ, Jacobs DK, Bodmer R, 2003. *AmphiNk2-tin*, an amphioxus homeobox gene expressed in myocardial progenitors: insights into evolution of the vertebrate heart. *Dev Biol* 255, 128-137.

Huvenne H, Smagghe G, 2009. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *J Insect Physiol* 56, 227-235.

I

Incardona JP, Gaffield W, Kapur RP, Roelink H, 1998. The teratogenic *Veratrum* alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* 125, 3553-3562.

Incardona JP, Gaffield W, Lange Y, Cooney A, Pentchev PG, Liu S, Watson JA, Kapur RP, Roelink H, 2000. Cyclopamine inhibition of Sonic hedgehog signal transduction is not mediated through effects on cholesterol transport. *Dev Biol* 224, 440-452.

Inman GJ, Nicolás FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ, Hill CS, 2002. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol*. 62, 65-74.

J

Jacobs DK, Wray CG, Wedeen CJ, Kostriken R, DeSalle R, Staton JL, Gates RD, Lindberg DR, 2000. Molluscan *engrailed* expression, serial organization, and shell evolution. *Evolution & Development* 2, 340-347.

Jacob J, Briscoe J, 2003. Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Rep* 4, 761-765.

Jagla K, Bellard M, Frasch M, 2001. A cluster of *Drosophila* homeobox genes involved in mesoderm differentiation programs. *Bioessays* 23, 125-133.

Johnson RL et Tabin C, 1995. The long and short of hedgehog signalling. *Cell* 81, 313-316.

K

Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser AG, Ahringer J, 2001. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* 2, 225-229.

Kanda S, Mochizuki Y, Suematsu T, Miyata Y, Nomata K, Kanetake H, 2003. *Sonic hedgehog* induces capillary morphogenesis by endothelial cells through phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 278, 8244-8249.

Kang D, Huang F, Li D, Shankland M, Gaffield W, Weisblat DA, 2003. A *hedgehog* homolog regulates gut formation in leech *Helobdella*. *Development* 130, 1645-1657.

Karlstrom RO, Tyurina OV, Kawakami A, Nishioka N, Talbot WS, Sasaki H, Schier, AF, 2003. Genetic analysis of zebrafish *gli1* and *gli2* reveals divergent requirements for *gli* genes in vertebrate development. *Development* 130, 1549-1564.

Kassar-Duchossoy L, Giaccone E, Gayraud-Morel B, Jory A, Gomès D, Tajbakhsh S, 2005. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev* 19, 1426-1431.

Katoh Y, Katoh M, 2006. Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling network (review). *Int J Mol Med* 6, 1019-10123.

Kawaguti S, Ikemoto N, 1957. Electron microscopy of the smooth muscle from the body wall of the earthworms, *Pheretima cimmunissima* and *Eisenia fætida*. *Biol J Okayama Univ* 3, 223-238.

Kier WM, 1985. The musculature of squid arms and tentacles: ultrastructural evidence for functional differences. *J Morphol* 185, 223-239.

Kier WM, 1991. Squid cross-striated muscle: the evolution of a specialized muscle fiber type. *Bull mar Sci* 49, 389-403.

Kier WM, Schachat FH, 1992. Biochemical comparison of fast- and slow-contracting squid muscle. *J Exp Biol* 168, 41-56.

Kier WM, 1996. Muscle development in squid: ultrastructural differentiation of a specialized muscle fiber type. *J Morphol* 229, 271-288.

Kier WM, Schachat FH, 2008. Muscle specialization in the squid motor system. *J Exp Biol* 211, 164-169.

Kilchherr F, Baumgartner S, Bopp D, Frei E, Noll M, 1986. Isolation of the *paired* gene of *Drosophila* and its spatial expression during early embryogenesis. *Nature* 321, 493-499.

Kim Y, Nirenberg M, 1989. *Drosophila* *NK-homeobox* genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 7716-7720.

Kling G, Schipp R, 1987. Comparative ultrastructural and cytochemical analysis of the cephalopod systemic heart and its innervation. *Experientia* 43, 502-511.

Kozmik Z, Holland ND, Kalousova A, Paces J, Schubert N, Holland L, 1999. Characterization of an amphioxus paired box gene, *AmphiPax2/5/8*: developmental expression patterns in optic support cells, nephridium, thyroid-like structures and pharyngeal gill slits, but not in the midbrain boundary region. *Development* 126, 1295-1304.

Kozmik Z, Daube M, Frei E, Norman B, Kos L, Dishaw LJ, Noll M, Piatigorsky J, 2003. Role of Pax genes in eye evolution: a cnidarian *PaxB* gene uniting *Pax2* and *Pax6* functions. *Dev Cell* 5, 773-785.

Krause M, Fire A, Harrison SW, Priess J, Weintraub H, 1990. CeMyoD accumulation defines the body wall muscle cell fate during *C. elegans* embryogenesis. *Cell* 63, 907-919.

Krauss S, Johansen T, Korzh V, Fjose A, 1991. Expression of the zebrafish paired box gene *pax[zf-b]* during early neurogenesis. *Development* 113, 1193-1206.

L

Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP, Ruggeri BA, 2007. *PAX* genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochem Pharmacol* 73, 1-14.

Larroux C, Fahey B, Degnan SM, Adamski M, Rokhsar DS, Degnan BM, 2007. The *NK* homeobox gene cluster predates the origin of *Hox* genes. *Curr Biol* 17, 706-710.

Larroux C, Degnan B, 2010. Expression of sponge “neural” genes: insights into the origin of neurons. 3^{ème} Conférence Européenne de Biologie Evolutive Développementale (Euro-Evo-Devo), Université Paris Diderot - Paris 7, France.

Le Guyader H, 1998. Geoffroy Saint-Hilaire. Ed. Belin, coll. Belin Sciences, Paris.

Lecointre G, Le Guyader H, 2001. Classification phylogénétique du vivant. Ed. Belin, Paris.

Lee PN, Callaerts P, De Couet HG, Martindale MQ, 2003. Cephalopod *Hox* genes and the origin of morphological novelties. *Nature* 424, 1061-1065.

Lemaire J, 1970. Table de développement embryonnaire de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). *Bull Soc Zool France* 95, 773-782.

Lemaire J, Richard A, 1970. Evolution embryonnaire de l'appareil génital: différenciation du sexe chez *Sepia officinalis* L. *Soc Zool France* 95, 475-477.

Levin M, Johnson RL, Stern CD, Kuehn M, Tabin C, 1995. A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* 82, 803-814.

Levin M, 1997. Left-right asymmetry in vertebrate embryogenesis. *Bioessays* 19, 287-296.

Levin M, Pagan S, Roberts DJ, Cooke J, Kuehn MR, Tabin CJ, 1997. Left/right patterning signals and the independent regulation of different aspects of situs in the chick embryo. *Dev Biol* 189, 57-67.

Li HS, Yang JM, Jacobson RD, Pasko D, Sundin O, 1994. *Pax-6* is first expressed in a region of ectoderm anterior to the early neural plate, implications for stepwise determination of the lens. *Dev Biol* 162, 181-194.

Li X, Noll M, 1993. Role of the *gooseberry* gene in *Drosophila* embryos: maintenance of *wingless* expression by a *wingless-gooseberry* autoregulatory loop. *EMBO J* 12, 4499-4509.

Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP, 1993. *Nkx-2.5*: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 119, 419-431.

Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP, 1995. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev* 9, 1654-1666.

M

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 321–373, Paris.

Mangold-Wirz K, 1963. Biologie des Céphalopodes benthiques et nectoniques de la mer catalane. *Vie Milieu suppl* 13, 1-285.

Mann R, Carroll SB, 2002. Molecular mechanisms of selector gene function and evolution. *Curr Opin Genet Dev* 12, 592 -600.

Manuel M, Price DJ, 2005. Role of *Pax6* in forebrain regionalization. *Brain Res Bull* 66, 387-393.

Marceau F, 1904. Sur le mécanisme de la contraction des fibres musculaires lisses dites à double striation oblique ou à fibrilles spiralées et en particulier de celles des muscles adducteurs des Lamellibranches. *C R Acad Sci Paris* 139, 70-72.

Marigo V, Roberts DJ, Lee SM, Tsukurov O, Levi T, Gastier JM, Epstein DJ, Gilbert DJ, Copeland NG, Seidman CE, 1995. Cloning, expression, and chromosomal location of *SHH* and *IHH*: two human homologues of the *Drosophila* segment polarity gene hedgehog. *Genomics* 28, 44-51.

Martin BL, Peyrot SM, Harland RM, 2007. *Hedgehog* signaling regulates the amount of hypaxial muscle development during *Xenopus* myogenesis. *Dev Biol* 304, 722-734.

Martindale MQ, 2005. The evolution of metazoan axial properties. *Nat Rev Genet* 12, 917-27.

Mason CA, Sretavan DW, 1997. Glia, neurons, and axon pathfinding during optic chiasm development. *Curr Opin Neurobiol* 7, 647-653.

Matsunaga E, Araki I, Nakamura H, 2000. *Pax6* defines the di-mesencephalic boundary by repressing *En1* and *Pax2*. *Development* 127, 2357-2365.

Mauro A, 1977. Extra-ocular photoreceptors of cephalopods. *Symposia of the Zoological Society of London* 38, 287–308.

Maynard D M, 1967. Organization of central ganglia. In: *Invertebrate Nervous Systems. Their Significance for Mammalian Neurophysiology*. Ed. Wiersma C. A. G., pp. 231-255, Chicago: Chicago University Press.

McCauley DW, Bronner-Fraser M, 2002. Conservation of *Pax* gene expression in ectodermal placodes of the lamprey. *Gene* 287, 129–139.

McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ, 2003. Developmental roles and clinical significance of *hedgehog* signaling. *Curr Top Dev Biol* 53, 1–114.

Messenger JB, 1971. Two-stage recovery of a response in *Sepia*. *Nature*, 232, 202–203.

Messenger JB, 1973. Learning performance and brain structure: a study in development. *Br Res* 58, 519-523.

Millman B, 1967. Mechanism of contraction in molluscan muscle. *Am Zoologist* 7, 583-591.

Minoo P, Su G, Drum H, Bringas P, Kimura S, 1999. Defects in tracheoesophageal and lung morphogenesis in *Nkx2.1(-/-)* mouse embryos. *Dev Biol* 209, 60-71.

Moshel SM, Levine M, Collier JR, 1998. Shell differentiation and *engrailed* expression in the *Ilyanassa* embryo. *Development Genes and Evolution* 208, 135-141.

Müller M, Jabs N, Lorke DE, Fritsch B, Sander M, 2003. *Nkx6.1* controls migration and axon pathfinding of cranial branchio-motoneurons. *Dev* 130, 5815-5826.

N

Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esumi E, Li S, Nonaka I, Nabeshima Y, 1993. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* 364, 532-535.

Naef A, 1923. Die Cephalopoden Systematik. In: Fauna e Flora del Golfo di Napoli Monografia 35, Teil 1-1. Bardi Roma., Friedländer & sons, pp 863, Berlin,.

Naef A, 1928. Die Cephalopoden (Embryologie). Roma, Berlin.

Navet S, Bassaglia Y, Baratte S, Martin M, Bonnaud L, 2008. Somatic muscle development in *Sepia officinalis* (Cephalopoda - Mollusca): a new role for *NK4*. *Developmental Dynamics* 237, 1944-1951.

Navet S, Andouche A, Baratte S, Bonnaud, L, 2009. *Shh* and *Pax-6* have unconventional expression patterns in embryonic morphogenesis in *Sepia officinalis* (Cephalopoda). *Gene Expression Patterns* 9, 461-467.

Navet S, Bassaglia Y, Baratte S, Andouche A, Bonnaud, L, 2010. Shell reduction and locomotory development in cephalopods: the recruitment of *engrailed* and *NK4* genes in *Sepia officinalis*. *Ferrantia* 59, 156-164.

Nederbragt AJ, van Loon AE, Dictus WJ 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.

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.

Nixon M, Messenger JB, 1977. *Biology of Cephalopods*. Academic Press Inc, Zoological Society Symposium.

Nixon M, Mangold K, 1998. The early life of *Sepia officinalis*, and the contrast with that of *Octopus vulgaris* (Cephalopoda). *J Zool Lond* 245, 407-421.

Nixon M, Young JZ, 2003. *The brains and lives of Cephalopods*. Oxford University Press, Oxford. UK.

Noll M, 1993. Evolution and role of *Pax* genes. *Curr Opin Genet Dev* 3, 595-605.

Nornes S, Clarkson M, Mikkola I, Pedersen M, Bardsley A, Martinez JP, Krauss S, Johansen T, 1998. Zebrafish contains two *pax6* genes involved in eye development. *Mech Dev* 77, 185-196.

Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E, 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.

Nutt SL, Thévenin C, Busslinger M, 1997. Essential functions of Pax-5 (BSAP) in pro-B cell development. *Immunobiology* 198, 227-235.

O

O'Brien EK, Degnan BM, 2000. Expression of *POU*, *Sox*, and *Pax* genes in the brain ganglia of the tropical abalone *Haliotis asinina*. *Mar Biotechnol* 2, 545-557.

O'Brien EK, Degnan BM, 2003. Expression of *Pax258* in the gastropod statocyst: insights into the antiquity of metazoan geosensory organs. *Evol Dev* 5, 572-578.

Ohkumo T, Masutani C, Eki T, Hanaoka F, 2008. Use of RNAi in *C. elegans*. *Methods Mol Biol* 442, 129-37.

Okkema PG, Fire A, 1994. The *Caenorhabditis elegans* NK-2 class homeoprotein CEH-22 is involved in combinatorial activation of gene expression in pharyngeal muscle. *Development* 120, 2175-2186.

Okkema PG, Ha E, Haun C, Chen W, Fire A, 1997. The *Caenorhabditis elegans* NK-2 homeobox gene *ceh-22* activates pharyngeal muscle gene expression in combination with *pha-1* and is required for normal pharyngeal development. *Development* 124, 3965-3973.

Olson EN, 2006. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science* 313, 1922-1927.

P

Packard A, 1972. Cephalopods and fish, the limits of convergence. *Biol Rev* 47, 241-307.

Palmer ME, Calvé MR, Adamo SA, 2006. Response of female cuttlefish *Sepia officinalis* (Cephalopoda) to mirrors and conspecifics: evidence for signaling in female cuttlefish. *Anim Cogn* 9, 151-155.

Park Y, Rangel C, Reynolds MM, Caldwell MC, Johns M, Nayak M, Welsh CJ, McDermott S, Datta S, 2003. *Drosophila* perlecan modulates *FGF* and *hedgehog* signals to activate neural stem cell division. *Dev Biol* 253, 247-257.

Paterson BM, Walldorf U, Eldridge J, Dübendorfer A, Frasch M, Gehring WJ, 1991. The *Drosophila* homologue of vertebrate myogenic-determination genes encodes a transiently expressed nuclear protein marking primary myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3782-3786.

Pattyn A, Vallstedt A, Dias JM, Sander M, Ericson J, 2003. Complementary roles for *Nkx6* and *Nkx2* class proteins in the establishment of motoneuron identity in the hindbrain. *Development* 130, 4149-4159.

Pfeffer PL, Gerster T, Lun K, Brand M, Busslinger M, 1998. Characterization of three novel members of the zebrafish *Pax2/5/8* family: dependency of *Pax5* and *Pax8* expression on the *Pax2.1* (*noi*) function. *Development* 125, 3063-3074.

Pilon M, Morck C, 2005. Development of *Caenorhabditis elegans* pharynx, with emphasis on its nervous system. *Acta Pharmacol Sin* 26, 396-404.

Pirkanen A, Kiefer JC, Hauschka SD, 2000. IGFs, insulin, *Shh*, *bFGF*, and *TGF-beta1* interact synergistically to promote somite myogenesis *in vitro*. *Dev Biol* 224, 189-203.

Popper AN, Platt C, 1993. Inner ear and lateral line. In: *The Physiology of Fishes*. Ed. CRC Press.

Prakash N, Wurst W, 2006. Genetic networks controlling the development of midbrain dopaminergic neurons. *J Physiol* 575, 403-410.

Preuss T, Budelmann BU, 1995. Proprioceptive hair cells on the neck of the squid *Lolliguncula brevis*, a sense organ in cephalopods for the control of head-to-body position. *Trans R Soc Lond B Biol Sci* 349, 153-178.

Q

Quigley IK, Xie X, Shankland M, 2007. *Hau-Pax6A* expression in the central nervous system of the leech embryo. *Dev Genes Evol* 217, 459-468.

Quiring R, Walldorf U, Kloter U, Gehring WJ, 1994. Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *Small eye* gene in mice and Aniridia in humans. *Science* 265, 785-789.

R

Reger J, 1964. The fine structure of the fibrillar network and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle cells of *Ascaris lumbricoides* (var, suum). *J Ultrastruct Res* 10, 48-57.

Reissmann E, Jörnvall H, Blokzijl A, 2001. The orphan receptor ALK7 and the Activin receptor ALK4 mediate signaling by Nodal proteins during vertebrate development. *Genes Dev* 15, 2010-2022.

Relaix FD, Rocancourt A, Mansouri A, Buckingham M, 2005. A Pax3/Pax7 dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 435, 948-953.

Riazi AM, Lee H, Hsu C, Van Arsdell G, 2005. CSX/Nkx2.5 modulates differentiation of skeletal myoblasts and promotes differentiation into neuronal cells in vitro. *J Biol Chem* 280, 10716-10720.

Rosenbluth J, 1965. Ultrastructural organization of obliquely striated muscle fibers in *Ascaris lumbricoides*. *J Cell Biol* 25, 495-515.

Rosenzweig MR, Bennett EL, 1996. Psychobiology of plasticity: Effects of training and experience on brain and behavior. *Behavioral Brain Research*, 78, 57-65.

Rowitch DH, McMahon AP, 1995. *Pax-2* expression in the murine neural plate precedes and encompasses the expression domains of *Wnt-1* and *En-1*. *Mech Dev* 52, 3-8.

Ryan KM, Hendren JD, Helander LA, Cripps RM, 2007. The NK homeodomain transcription factor Tinman is a direct activator of *seven-up* in the *Drosophila* dorsal vessel. *Dev Biol* 302, 694-702.

S

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24, 104-108.

Saudemont A, Dray N, Hudry B, Le Gouar M, Vervoort M, Balavoine G, 2008. Complementary striped expression patterns of *NK* homeobox genes during segment formation in the annelid *Platynereis*. *Dev Biol* 317, 430-443.

Saunders WB and Landman NH, 1987. Ecology, distribution and population characteristics of *Nautilus*. Plenum Publishing Corp, New York.

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.

Schipp R, 1987. General morphological and functional characteristics of the cephalopod circulatory system. An introduction. *Experientia* 43, 474-477.

Schmerer M, Savage RM, Shankland M, 2009. *Paxβ*: a novel family of lophotrochozoan *Pax* genes. *Evol Dev* 11, 689-696.

Seaver EC, Kaneshige LM, 2006. Expression of 'segmentation' genes during larval and juvenile development in the polychaetes *Capitella sp. I* and *H. elegans*. *Dev Biol* 289, 179-194.

Sherrard KM, 2000. Cuttlebone morphology limits habitat depth in eleven species of *Sepia* (Cephalopoda: Sepiidae). *Biol Bull* 198, 404-414.

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.

Simonnet F, Deutsch J, Quéinnec E, 2004. *hedgehog* is a segment polarity gene in a crustacean and a chelicerate. *Dev Genes Evol* 214, 537-545.

Song DL, Chalepakis G, Gruss P, Joyner AL, 1996. Two Pax-binding sites are required for early embryonic brain expression of an *Engrailed-2* transgene. *Development* 122, 627-635.

Spiess PE, 1972. Organogenese des Schalendrüsenskomplexes bei einigen coleoiden Cephalopoden des Mittelmeeres. *Revue Suisse de Zoologie* 79, 167-226.

Stemple D, 2000. Vertebrate development: The fast track to Nodal signalling. *Current Biology* 10, R843-R846.

Sun Z, Jin P, Tian T, Gu Y, Chen YG, Meng A, 2006. Activation and roles of ALK4/ALK7-mediated maternal TGFbeta signals in zebrafish embryo. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 694-703.

T

Tapscott SJ, 2005. The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *Development* 132, 2685-2695.

Tessmar-Raible K, Raible F, Christodoulou F, Guy K, Rembold M, Hausen H, Arendt D, 2007. Conserved sensory-neurosecretory cell types in annelid and fish forebrain: insights into hypothalamus evolution. *Cell* 129, 1389-400.

Tomarev SI, 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.

Torres M, Gómez-Pardo E, Gruss P, 1996. Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development* 122, 3381-3391.

Traiffort E, Angot E, Ruat M, 2010. Sonic Hedgehog signaling in the mammalian brain. *J Neurochem* 3, 576-590.

Trueba SS, Augé J, Mattei G, Etchevers H, Martinovic J, Czernichow P, Vekemans M, Polak M, Attié-Bitach T, 2005. *PAX8*, *TITF1*, and *FOXE1* gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 455-462.

Trueman ER, Packard A, 1968. Motor performances of some cephalopods. *J Exp Bio* 49, 495-507.

Tsao DH, Gruschus JM, Wang LH, Nirenberg M, Ferretti JA, 1994. Elongation of helix III of the NK-2 homeodomain upon binding to DNA: a secondary structure study by NMR. *Biochemistry* 33, 15053-15060.

Tsukui T, Capdevila J, Tamura K, Ruiz-Lozano P, Rodriguez-Esteban C, Yonei-Tamura S, Magallón J, Chandraratna RA, Chien K, Blumberg B, Evans RM, Belmonte JC, 1999. Multiple left-right asymmetry defects in *Shh*(^{-/-}) mutant mice unveil a convergence of the *shh* and retinoic acid pathways in the control of *Lefty-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11376-11381.

U

Ungos JM, Karlstrom RO, Raible DW, 2003. *Hedgehog* signaling is directly required for the development of zebrafish dorsal root ganglia neurons. *Development* 130, 5351-5362.

V

Venuti JM, Goldberg L, Chakraborty T, Olson EN, Klein WH, 1991. A myogenic factor from sea urchin embryos capable of programming muscle differentiation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6219-6223.

W

Wada H, Saiga H, Satoh N, Holland PW, 1998. Tripartite organization of the ancestral chordate brain and the antiquity of placodes: insights from ascidian *Pax-2/5/8*, *Hox* and *Otx* genes. *Development* 125, 1113-1122.

Wada S, Tokuoka M, Shoguchi E, Kobayashi K, Di Gregorio A, Spagnuolo A, Branno M, Kohara Y, Rokhsar D, Levine M, Saiga H, Satoh N, Satou Y, 2003. A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*. *Dev Genes Evol* 213, 222-234.

Walther C, Gruss P, 1991. *Pax-6*, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113, 1435-1449.

Warren N, Caric D, Pratt T, Clausen JA, Asavaritikrai P, Mason JO, Hill RE, Price DJ, 1999. The transcription factor, *Pax6*, is required for cell proliferation and differentiation in the developing cerebral cortex. *Cereb Cortex* 9, 627-635.

Wei Q, Rong Y, Paterson BM, 2007. Stereotypic founder cell patterning and embryonic muscle formation in *Drosophila* require *nautilus* (*MyoD*) gene function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5461-5466.

Weintraub H, 1993. The *MyoD* family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75, 1241-1244.

Weiss JB, Von Ohlen T, Mellerick DM, Dressler G, Doe CQ, Scott MP, 1998. Dorsoroventral patterning in the *Drosophila* central nervous system: the intermediate neuroblasts defective homeobox gene specifies intermediate column identity. *Genes Dev* 22, 3591-3602.

Wells M, Smith P, 1987. The performance of the octopus circulatory system, a triumph of engineering over design. *Experientia* 43, 487-499.

Williamson R, Chrachri A, 2007. A model biological neural network: the cephalopod vestibular system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362, 473-481.

Woodruff JB, Mitchell BJ, Shankland M, 2007. *Hau-Pax3/7A* is an early marker of leech mesoderm involved in segmental morphogenesis, nephridial development, and body cavity formation. *Dev Biol* 306, 824–837.

Wotton KR, Weierud FK, Juárez-Morales JL, Alvares LE, Dietrich S, Lewis KE, 2009. Conservation of gene linkage in dispersed vertebrate *NK* homeobox clusters. *Dev Genes Evol* 219, 481–496.

Y

Young JZ, 1939. Fused neurones and synaptic contacts in the giant nerve fibers of Cephalopod. *Philos Trans R Soc Lond B* 229, 465-503.

Yochelson EL, Flower RH, Webers GF, 1973. The bearing of the new late Cambrian monoplacophoran Knightconus upon the origin of the Cephalopoda. *Lethaia* 6, 275–309.

Young RE, Vecchione M, Donovan D, 1998. The evolution of coleoid cephalopods and their present biodiversity and ecology. *South African Jour Mar Sci* 20, 393-420.

Young JZ, 1971. The anatomy of the nervous system of *Octopus vulgaris*. Clarendon press, Oxford.

Young JZ, 1967. The visceral nerves of *Octopus*. *Philos Trans roy Soc Lond B* 782, 1-22.

Z

Zaffran S, Das G, Frasch M, 2000. The NK-2 homeobox gene *scarecrow* (*scro*) is expressed in pharynx, ventral nerve cord and brain of *Drosophila* embryos. *Mech Dev* 94, 237-241.