



Haeckel 1904. *Kunstformen der Natur*, plate 27: Ctenophorae

1. *Haeckelia rubra* (Gegenbaur, Kölliker & Müller, 1853), vue aborale. 2. *Haeckelia rubra* (Gegenbaur, Kölliker & Müller, 1853), vue latérale. 3. *Hormiphora* sp., vue latérale. 4. *Callianira bialata* Delle Chiaje, 1841, vue latérale. 5. *Tinerfe cyanea* (Chun, 1889), vue latérale. 6. *Lampea pancerina* (Chun, 1879), vue latérale

## Résumé

Les cténaires, par leur position phylogénétique en dehors des bilatériens, mais également par l'originalité et la complexité de leur organisation, constituent un groupe crucial pour comprendre les évènements anciens de l'évolution animale. L'espèce *Pleurobrachia pileus* est un modèle bien adapté aux études moléculaires sur les types cellulaires et leur dynamique au sein d'un cténaire adulte. Ce travail de thèse comporte un premier volet, consacré aux cellules souches, dans lequel j'ai pu mettre en évidence l'expression des gènes Vasa, Piwi, PL10 et Bruno (réputés marqueurs de lignée germinale, chez les modèles animaux classiques) dans différentes populations de cellules souches spécialisées dans la production de dérivés somatiques, ainsi que dans la lignée germinale. Associés aux données concernant d'autres modèles « non classiques », ces résultats suggèrent que cette combinatoire de gènes serait ancestralement liée non seulement à la lignée germinale, mais également aux cellules souches quelle que soit leur nature. Un second volet de la thèse porte sur certains aspects de l'origine du système neuro-sensoriel, plus particulièrement de la synapse chimique. Une étude de génomique comparative a permis de reconstituer l'histoire du complexe protéique formant la densité post-synaptique des neurones de mammifères, le principal résultat étant que les protéines formant le cœur de ce complexe ont émergé chez un ancêtre commun unicellulaire des choanoflagellés et des animaux. Par ailleurs je me suis intéressé à l'évolution de la transmission cholinergique, à travers l'étude de deux paralogues du transporteur à haute affinité de la choline CHT chez *Pleurobrachia pileus*. L'expression d'un de ces gènes dans des territoires neuraux tend à confirmer l'existence de neurones cholinergiques chez les cténaires. Toutefois, l'existence pour les deux paralogues de divers sites d'expression non neuraux (au niveau de l'ectoderme et de l'endoderme du cténaire) suggère que, bien que CHT a été acquis au même niveau de l'arbre (la branche des eumétazoaires) que les synapses et les neurones, son expression n'est pas ancestralement liée de manière spécifique aux neurones cholinergiques. L'ensemble de ces résultats est replacé dans le cadre d'une réflexion sur les difficultés posées par le concept de type cellulaire, ainsi que par le concept d'innovation évolutive en ce qui concerne l'origine du système neuro-sensoriel. Enfin, ce travail met également en relief l'importance de mieux connaître les cténaires afin de mieux appréhender leur morpho-anatomie et leur diversité.

## Abstract

The phylogenetic position of ctenophores, together with their unique body plan and its complexity, make them a crucial group for investigating the ancient events of animal evolution. The model species *Pleurobrachia pileus* is convenient for molecular studies dealing with cell types and their dynamics in an adult ctenophore. This work comprises a first part focused on stem cells, in which I notably showed the expression of Vasa, Piwi, PL10 and Bruno genes (previously considered as germline markers in classical animal models) in different stem cell populations, each specialised in the production of particular somatic derivatives, in addition to the germline. Together with data from other “non classical” models, these results suggest that this gene combinatory was ancestrally linked not only to the germline, but also to stem cells whatever the fate or their progeny. Another part of my work deals with the origin of the neuro-sensory system, particularly of the chemical synapse. A comparative genomic study was undertaken to reconstruct the history of the protein complex known as the post-synaptic density in mammals. The main result is that the backbone of this complex emerged in a unicellular ancestor of choanoflagellates and metazoans. I also addressed the evolution of cholinergic transmission through the study of two paralogues of the high-affinity choline transporter CHT, in *Pleurobrachia pileus*. One parologue had neural expression territories, which tends to confirm the existence of cholinergic neurons in ctenophores. However, both paralogues also had various non neural expression sites, suggesting that although CHT was acquired in the same branch of the phylogenetic tree as synapses and neurons (i.e. the eumetazoan branch), its expression was not ancestrally specific to cholinergic neurons. All these results are integrated into a general discussion concerning the difficulties raised by the concept of cell types, as well as by the concept of evolutionary novelty in the particular context of the origin of the neuro-sensory system. Finally, this work highlights how it is important to improve our knowledge of ctenophores in order to better grasp their morpho-anatomy and diversity.

## Remerciements

En premier lieu je voudrais remercier tous les membres de l'équipe Evo-Devo.

Michaël, depuis mon stage de Master tu m'as guidé dans cette aventure avec les cténaires. J'en suis tellement heureux! Parfois tu m'as montré le chemin, parfois tu as marché à mes côtés, et parfois c'est toi qui m'as suivi... ce qui m'a donné une grande confiance en moi. Merci pour tout ce que tu m'as transmis, tes connaissances et ta passion. Merci de m'avoir préparé à ce qui m'attend maintenant, une vie de science aussi riche je l'espère, que la tienne.

Cyrielle, ma collègue idéale, toujours souriante et toujours positive. Ton honnêteté, sur le plan humain et sur le plan scientifique, ton enthousiasme surtout, ont rendu incroyablement riche notre interaction. Une grande partie de cette thèse est le fruit de nos échanges.

Muriel, tu m'as formé à la pailasse, mais pas seulement. L'importance évidente que tu places dans l'observation, la description, et dans la rigueur que cela requiert, me remplit d'admiration. C'est également ta façon si sereine, si réfléchie d'appréhender la vie dans le laboratoire, mais aussi la vie en dehors, qui a eu sur moi une influence très grande.

Eric, pour moi comme pour les autres membres de notre équipe, tu es l'empêcheur de tourner en rond. Tout questionner, remettre en cause, tout déconstruire pour mieux reconstruire. Lire, observer. C'est l'enseignement que tu m'as distillé, de ta façon si particulière, à ta manière propre, sans y paraître. Cette thèse et les articles qu'elle contient doivent beaucoup à mon désir d'être à ta hauteur.

Lucas, merci pour ces trois années de collaboration. Bien que tu sois en Norvège depuis bientôt 2 ans, nous continuons à travailler ensemble. J'espère que nous jouerons encore sur le même terrain dans les années à venir.

Pierette, mes débuts de thèse n'auraient pas été les mêmes sans toi. D'abord parce que tu m'as beaucoup aidé dans le labo, mais aussi parce que l'on a vraiment beaucoup rigolé, n'ayant ni l'un ni l'autre la langue dans notre poche. Tu as su m'épauler et je t'en remercie de tout cœur.

Je voudrais également remercier Hervé le Guyader, au titre de directeur du laboratoire, de m'avoir accueilli depuis trois ans et demi. C'est aussi le directeur de l'école doctorale Diversité du Vivant que je souhaite remercier. Les journées d'échange à Roscoff ont vraiment participé de l'impression que j'ai d'être entouré par une équipe, une structure.

Merci également à Marie Donatien, qui m'a sauvé la mise plus d'une fois. Elles est pour les doctorants de l'EDDV un rayon de soleil qui ne cesse jamais de briller.

Merci à Philippe Leballeur, pour sa disponibilité et son efficacité. Philippe merci aussi pour toutes ces heures de bonnes musiques, pour toutes ces discussions autour du café. Compte sur moi pour t'envoyer du Japon tous les meilleurs sons de la scène grunge !

Merci à tous les membres du laboratoire qui m'ont apporté de l'aide au cours de cette thèse : Eric Baptiste, Philippe Lopez, les membres de l'équipe AMEX et particulièrement Magalie Zbinden, Marie Pailleret et Sébastien Halary pour le microtome et le microscope électronique, Danielle Merkiled, Latifa Belkessa, Dominique Higuet, et bien-sûr Denise Busson.

Merci également à Lydie Morel et Etienne Herzog de m'avoir formé au Cryostat. Merci à Line Le Gall de m'avoir accueilli avec tant de gentillesse.

Merci à tous les membres de mon comité de thèse : Nicolas Vidal, Carole Borchellini, Sylvie Rétaux, Hervé le Guyader. Les deux réunions de mon comité ont donné lieu à des échanges très enrichissants, qui ont beaucoup apporté aux articles présentés dans cette thèse.

Merci à Alexandre Hassanin de m'avoir mis le pied à l'étrier, et de m'avoir si bien conseillé pour mon orientation en début de M2.

Pour m'avoir accueilli durant mes séjours de récolte à Villefranche-sur-mer, je souhaite exprimer ici toute ma gratitude envers Evelyn Houliston, et toute l'équipe Déterminants Maternels, Cécile Fourrage, Sandra Chevalier, Tsuyoshi Momose, Aldine Amiel et Carine Barreau. J'ai autant de plaisir à vous voir qu'à récolter des cténaires, dommage que cela ne dure chaque fois que quelques semaines.

Un merci tout particulier à Patrick Chang. Les heures passées au microtome, dans cette petite pièce derrière la bibliothèque, la musique de la mer et la danse de la lame sur le bloc, comptent parmi mes instants les plus chers.

Merci également à tous les autres membres de la Station Océanographique de Villefranche-sur-mer que j'ai été amené à solliciter, et notamment Ornella Passafiume et Laurent Giletta.

Pour les cténaires récoltés, un grand merci à l'équipe de marins des stations de Roscoff et Villefranche. Avec une mention spéciale bien-sûr pour Jean-Yves Carval et Fabrice (Alias Petit Corailleur). J'espère du fond du cœur que l'on se retrouvera à nouveau ensemble sur la Vélelle ou la Sagitta.

Pour écrire les premières lignes de cette thèse, et pour en faire la dernière relecture, j'ai bénéficié de la douce hospitalité de Claire Pessin. A l'ombre d'un noyer qui était en fleur et qui porte aujourd'hui ses fruits d'automne, j'ai puisé l'inspiration dans la terre du Marais.

Jamais je n'aurais pu poursuivre ainsi mes études si je n'avais reçu le soutien sans limite de ma mère, et de mon frère Jean-Baptiste. Merci à vous deux de toujours m'écouter, de toujours vous intéresser. Dans une thèse il y a des hauts, et des bas, et ma famille est un phare qui brille toujours, sans flancher.

Enfin, Mélodie, comment aurais-je pu donner tant d'énergie dans mon travail de thèse sans tes encouragements, sans ta bienveillance ? Merci de m'avoir porté, à tous les instants. Merci de me donner cet équilibre stable qui me permet d'avancer, en sécurité avec toi.

Quand on a pour bagage l'amour des êtres chers, on peut aller aussi loin qu'on le désire.

## Sommaire

Résumé .....	2
Remerciements .....	2
Sommaire .....	6
<b>1. Les cténaires, leur originalité et leur importance du point de vue de l'évolution animale .....</b>	<b>9</b>
1.1. Morpho-anatomie et biologie du cténaire <i>Pleurobrachia pileus</i> (Müller 1776) .....	9
1.1.1. Morphologie générale de l'adulte.....	11
1.1.2. Communication épithéliale et communication nerveuse.....	13
1.1.3. Tentacule et tentilles.....	17
1.1.4. La racine tentaculaire, réserve de cellules souches et usine à produire du tentacule et des tentilles .....	18
1.1.5. Les cténaires possèdent-ils un mésoderme ? .....	21
1.2. Classification et position phylogénétique des cténaires .....	22
1.2.1. Classification des cténaires.....	22
1.2.2. Position phylogénétique des cténaires dans l'arbre des métazoaires.....	24
A - Pas de consensus d'après les caractères morphologiques .....	25
B - L'ère de la phylogénomique : retour à l'hypothèse traditionnelle des cœlentérés .....	26
C Impact de la position phylogénétique des cténaires sur les scénarios d'évolution des caractères morphologiques .....	30
1.3. De l'embryologie à l'évo-dévo et à l'anatomie moléculaire .....	31
1.3.1. Embryologie descriptive et expérimentale des cténaires.....	31
1.3.2. Les travaux modernes d'évo-dévo sur les cténaires .....	33
A - Les travaux sur <i>Mnemiopsis leidyi</i> .....	34
B - L'adulte de <i>Pleurobrachia pileus</i> : entre évo-dévo et anatomie moléculaire.....	35

<b>2. Analyse critique du concept de cellule souche et recherche d'une signature moléculaire ancestrale.....</b>	39
2.1. Disparité et unicité des cellules souches chez les modèles classiques de bilatériens .....	41
2.1.1. Le neuroblaste larvaire de drosophile : une division intrinsèquement asymétrique.....	41
2.1.2. La cellule souche germinale de la drosophile femelle : sous contrôle de la niche .....	43
2.1.3. La cellule souche hématopoïétique des mammifères : une cellule souche multipotente qui se maintient sur le long terme.....	46
2.1.4. La cellule souche embryonnaire des mammifères est-elle vraiment une cellule souche ?..	48
2.1.5. Quelques caractéristiques partagées par les cellules souches, mais qui ne leur sont pas propres.....	50
A - La régulation de la phase G1 du cycle cellulaire.....	50
B - La question du lien entre l'état indifférencié et les cellules souches.....	51
C - L'activité télomérase protège l'intégrité du génome .....	52
2.1.6. Conclusion : Peut-on considérer la cellule souche comme un type cellulaire ? .....	53
2.2. Expression des « marqueurs de la lignée germinale » dans des cellules souches multi- et totipotentes chez de nouveaux organismes modèles .....	56
2.2.1. Les hémoblastes des ascidies coloniales .....	57
2.2.2. Les néoblastes des planaires.....	60
2.2.3. Les cellules interstitielles des hydrozoaires.....	63
2.2.4. Les archéocytes de démosponges .....	66
2.3. Etude de l'expression de <i>Piwi</i> , <i>Vasa</i> , <i>PL10</i> et <i>Bruno</i> chez l'adulte du cténaire <i>Pleurobrachia pileus</i> .....	68
2.3.1. Objectifs du travail présenté dans l'article 1 .....	68
2.3.2. Résumé des résultats et conclusions de l'article 1 .....	69
2.3.3. Article 1 : “Somatic stem cells express Piwi and Vasa genes in an adult ctenophore : ancient association of “germline genes” with stemness” .....	70
<b>3. Le problème de l'origine du système neuro-sensoriel : contributions touchant à l'évolution des synapses chimiques.....</b>	122
3.1. Introduction. L'origine du système neuro-sensoriel : innovations et co-options .....	122
3.1.1. L'acquisition du système nerveux : une réalité particulièrement complexe.....	122
3.1.2. Au-delà du neurone : le continuum neuro-sensoriel et ses implications évolutives.....	126
3.1.3. Les cellules neuro-sensorielles (au s.l.) : un « bricolage de l'évolution ».....	131

A - La perception de stimuli environnementaux .....	131
B - La formation et la conduction des potentiels d'action.....	133
C – Intermède. Les « innovations-clés » des eumétazoaires sous-tendant l’acquisition du système neuro-sensoriel.....	137
D - La signature moléculaire de la cellule neurosensorielle : co-option et innovation génétique .....	139
E- La synapse chimique, une zone de communication paracrine spécialisée.....	141
 3.1.4. Objectifs du travail présenté dans les Articles 2 et 3.....	144
 3.2 Article 2 : “The backbone of the post-synaptic density originated in a unicellular ancestor of choanoflagellates and metazoans”.....	145
 3.3. Article 3 : “Evolution de la transmission cholinergique : expression du transporteur CHT chez <i>Pleurobrachia pileus</i> ” .....	156
 <b>4. Conclusions et perspectives .....</b>	<b>177</b>
4.1. Rappel des principaux résultats de mon travail de thèse .....	177
4.2. Quelques réflexions suscitées par ces résultats .....	178
4.3. Perspectives .....	180
 <b>Références citées dans les chapitres en français .....</b>	<b>183</b>
 <b>Annexe 1 : Article 4 : “New insights on ctenophore neural anatomy: immunofluorescence study in Pleurobrachia pileus (Müller, 1776)” .....</b>	<b>206</b>
 <b>Annexe 2 : Article 5 : “Improved Phylogenomic Taxon Sampling Noticeably Affects Nonbilaterian Relationships” .....</b>	<b>256</b>

# 1

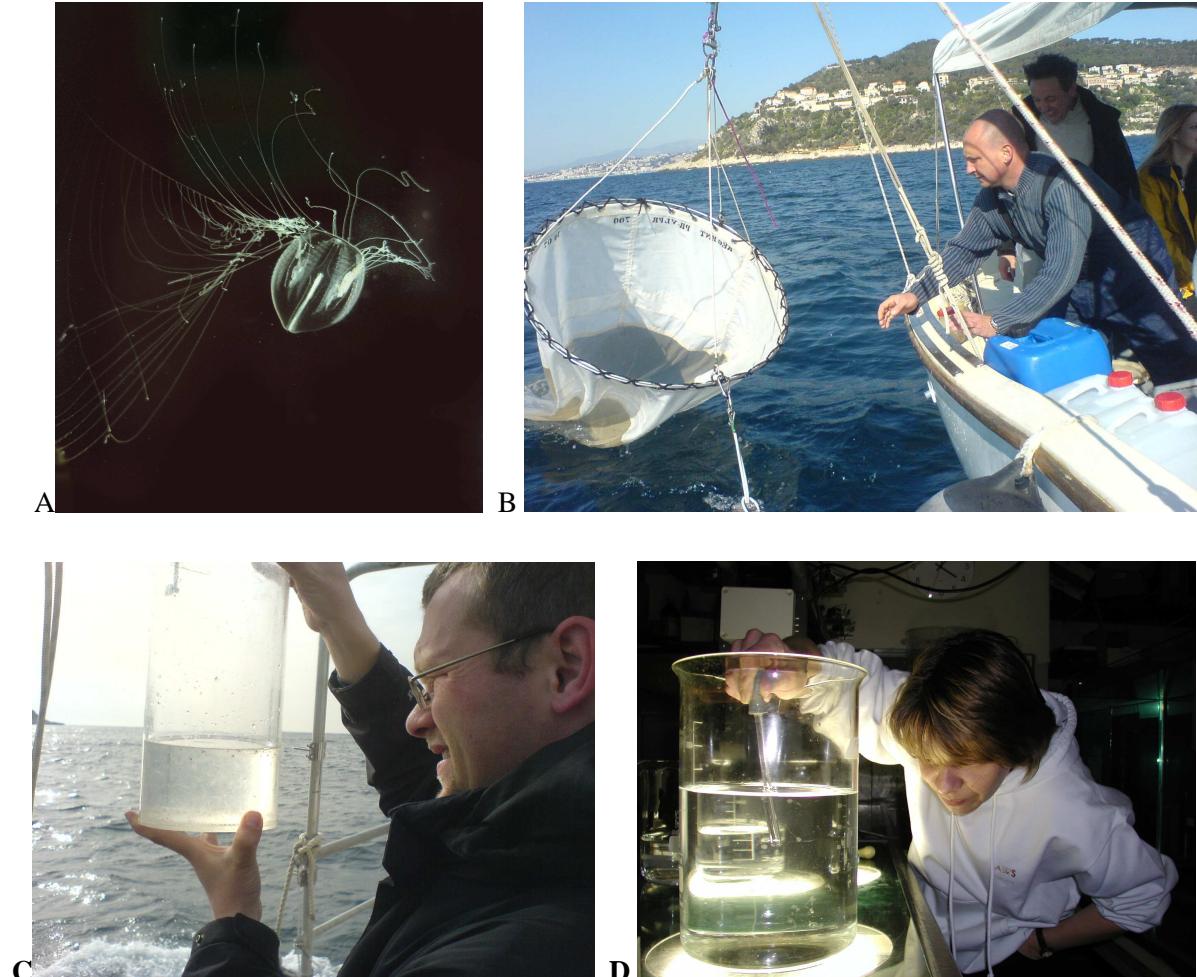
## Les cténaires, leur originalité et leur importance du point de vue de l'évolution animale

Les cténaires (Ctenophora) forment un embranchement (ou phylum) comportant 150 espèces marines décrites, planctoniques, benthiques ou épibiontes. Ce groupe se singularise par l'extrême originalité de son plan d'organisation, mais aussi par son importance capitale pour reconstituer l'évolution de certains caractères clefs de l'organisation des métazoaires, du fait de sa position phylogénétique extérieure aux Bilateria (ou comme on dit souvent improprement, « à la base de l'arbre des métazoaires »). Ce chapitre débute par une présentation des grandes lignes de la morpho-anatomie de l'espèce utilisée comme modèle dans ce travail de thèse, la groseille de mer *Pleurobrachia pileus*. Puis, je donnerai un aperçu de la classification des cténaires, ainsi que du problème de leur positionnement phylogénétique, avant de résumer les travaux déjà publiés concernant l'évo-dévo des cténaires. Les illustrations de ce chapitre sont en partie tirées de la littérature, et en partie originales, issues des études morpho-anatomiques menées dans l'équipe (voir indications données à la fin de chaque légende). Par ailleurs, une étude approfondie de la neuroanatomie de *Pleurobrachia pileus* par immunofluorescence est présentée en annexe 1 (article 4).

### 1.1. Morpho-anatomie et biologie du cténaire *Pleurobrachia pileus* (Müller 1776)

La groseille de mer *Pleurobrachia pileus* (Fig. 1A) est une espèce répandue sur toutes les côtes européennes. Elle est relativement abondante dans les régions littorales, mais saisonnière et à éclipses. Comme beaucoup d'animaux du macroplancton, elle est surtout récoltée au cours de phénomènes de blooms (explosions démographiques) plus ou moins aléatoires dans leur occurrence et leur durée. Ces caractéristiques représentent une contrainte assez importante dans le cadre de la recherche expérimentale. De plus, comme pour les autres cténaires, il est pratiquement impossible d'élever cette

espèce en laboratoire.<sup>1</sup> Le matériel utilisé pendant ma thèse a été principalement récolté dans la baie de Villefranche-sur-Mer et à Roscoff, chaque année entre mars et juin, en utilisant un filet à plancton dérivant depuis un bateau (Fig. 1B-D).



**Figure 1.** Le cténaire *Pleurobrachia pileus* (A) se récolte avec un filet à plancton traîné derrière un petit chalutier dirigé ici par un marin de la Station Zoologique de Villefranche-sur-mer (B). On récupère le trait de plancton (C) que l'on trie au retour sur une table lumineuse pour isoler les cténaires (D). *Photos originales.*

---

<sup>1</sup> Nous parvenons toutefois à maintenir les adultes pendant quelques semaines et à obtenir des pontes et des développements embryonnaires.

### 1.1.1. Morphologie générale de l'adulte

*Pleurobrachia pileus* est un animal planctonique, de forme à peu près sphérique, mesurant 1 à 2 cm de diamètre. Les structures que l'on remarque d'emblée lorsque l'on observe l'animal dans son milieu (Fig. 1A, Fig. 2A) sont ses deux tentacules qui s'étendent de chaque côté de son corps et ses huit rangées de palettes natatoires, appelées peignes, qui battent de façon synchronisée en diffractant joliment la lumière. Au pôle aboral, un organe d'équilibration – appelé organe apical – et deux aires de cellules ciliées – appelées champs polaires – forment le complexe sensoriel aboral (Fig. 2A). Le système gastrovasculaire communique avec l'extérieur à l'une de ses extrémités par la bouche, et à l'autre par deux pores anaux ; il diffère en cela de celui des cnidaires, qui ne présente qu'un seul orifice. *Pleurobrachia pileus*, comme les autres cténaires, présente une symétrie biradiaire : le plan de symétrie tentaculaire est matérialisé par les tentacules ; le plan de symétrie pharyngien (ou sagittal) est matérialisé par les champs polaires et par l'aplatissement du pharynx ; ainsi les plans de symétrie délimitent quatre quadrants (Fig. 2A, C).

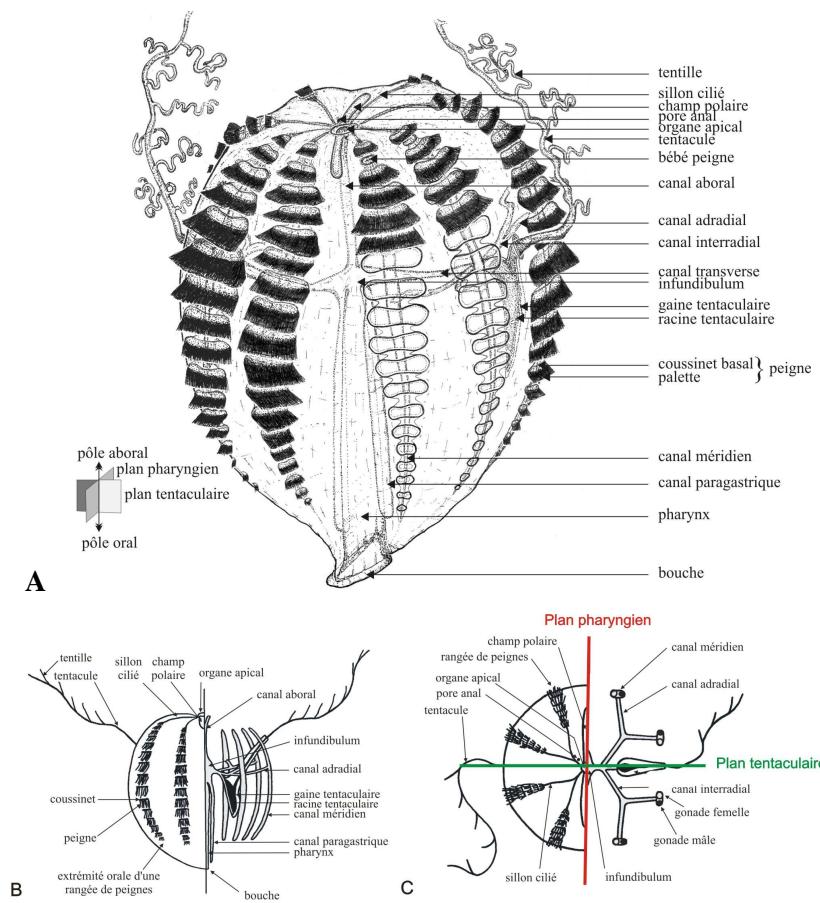
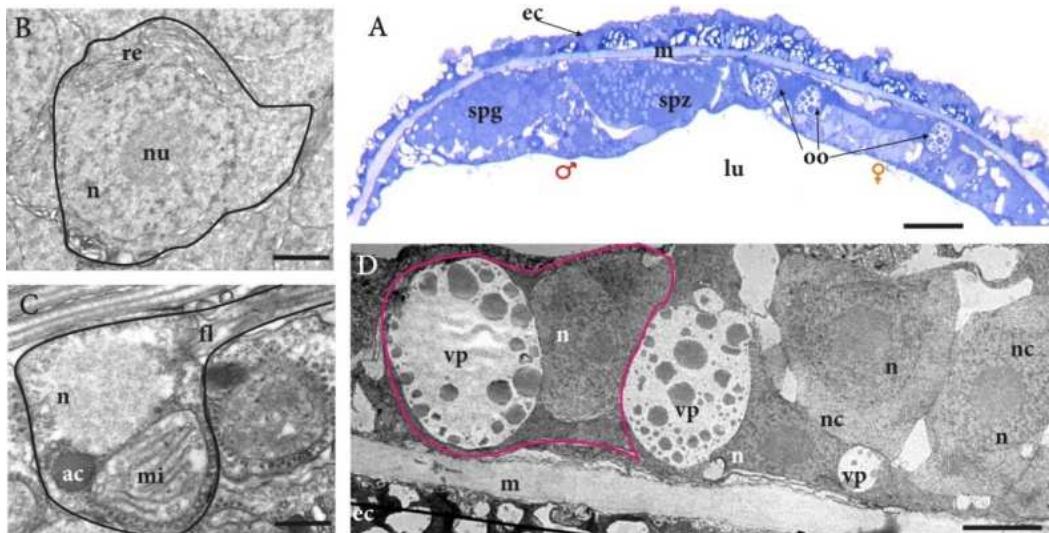


Figure 2. Symétrie, polarité et anatomie générale du cténaire *Pleurobrachia pileus*. (A) Dessin du cténaire *Pleurobrachia pileus*. (B) Vue latérale et (C) vue aborale de *P. pileus* montrant l'axe de polarité oral / aboral ainsi que les deux plans de symétrie définissant la symétrie biradiaire. Sur chaque dessin, la partie droite montre les canaux endodermiques ainsi que la racine tentaculaire. Sources : (A) Jager et al. (2008) (dessin d'Eric Quéinnec) ; (B) et (C) Derelle & Manuel (2007) (dessin de Romain Derelle).

On peut noter que les huit rangées de peignes sont distribuées deux par deux autour du corps selon une symétrie tétraradiaire, qui se superpose donc à la symétrie biradiaire. Enfin, les deux pores anaux sont localisés dans deux quadrants diagonalement opposés, ce qui constitue une altération de la symétrie de l'animal.

Le système gastrovasculaire de *Pleurobrachia* comporte un pharynx ectodermique et des canaux endodermiques ramifiés qui parcourent tout le corps pour distribuer les nutriments. Dans la paroi des canaux endodermiques méridiens se forment les gonades mâles et femelles (Fig. 3) : les cténaires sont hermaphrodites, et les gamètes sont évacués vers l'extérieur par des gonopores.



**Figure 3.** Organisation de la gonade de *Pleurobrachia pileus*. (A) Coupe semi-fine colorée au bleu de toluidine montrant la portion de la paroi du canal méridien contenant les gonades. La gonade mâle est à gauche (♂) et la gonade femelle à droite (♀). Les étapes de la spermatogenèse sont clairement ségrégées, les stades les plus tardifs étant les plus internes (spz pour spermatozoïdes ; et spg pour stades de la spermatogenèse). (B) Détail en microscopie électronique à transmission (MET) d'une spermatogonie, avec un gros noyau (n) contenant un nucléole (nu) et un réticulum endoplasmique (re) bien développé. (C) Détail au MET d'un spermatozoïde où sont visibles la base du flagelle (fl), le noyau (n), une grande mitochondrie (mi) et une vésicule acrosomale (ac). (D) Portion de la gonade femelle vue au MET montrant notamment un ovocyte (entouré en rose) contenant une grosse masse vitelline (vp). **ec** : ectoderme, **fl** : flagelle, **lu** : lumière du canal méridien, **m** : mésoglée, **mi** : mitochondrie, **n** : noyau, **nc** : cellule nourricière, **nu** : nucléole, **oo** : ovocytes, **re** : réticulum endoplasmique, **spg** : stades de la spermatogenèse, **spz** : spermatozoïdes, **vp** : masse vitelline. *Images réalisées par Alexandre Alié et Cyrielle Dayraud, en collaboration avec Patrick Chang et Sophie Pagnotta.*

Dans les paragraphes suivants, je vais fournir quelques éclairages plus approfondis sur quelques aspects de l'organisation de *P. pileus* qui me paraissent particulièrement intéressants.<sup>2</sup>

<sup>2</sup> Les données originales présentées dans l'article 4 (Annexe 1) ne seront pas répétées ici.

### 1.1.2. Communication épithéliale et communication nerveuse

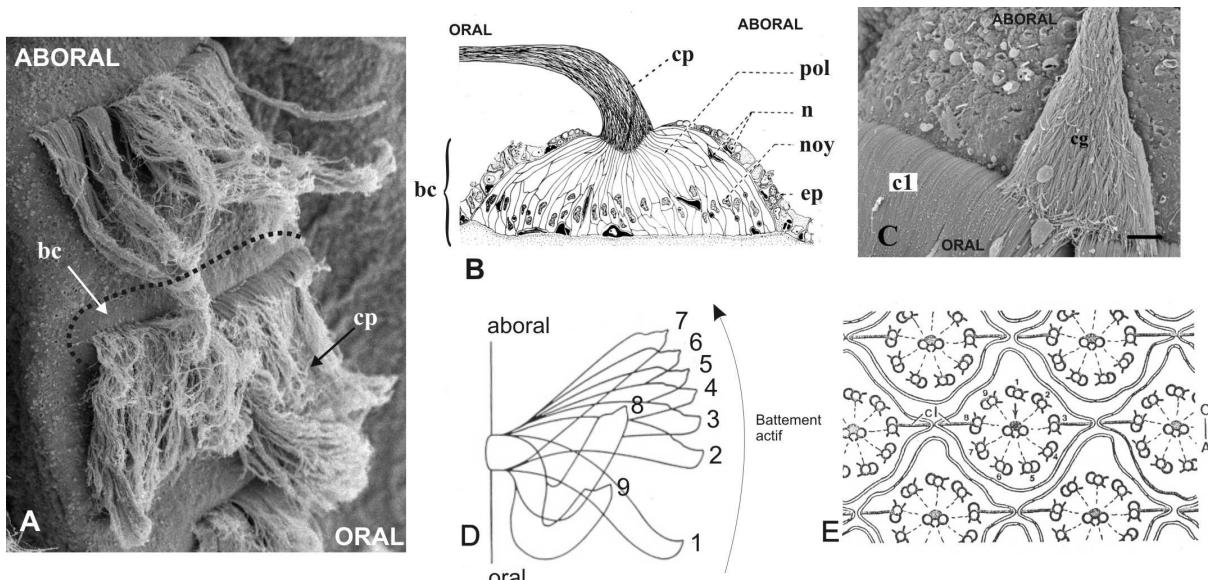
Les cténaires possèdent un système nerveux élaboré (différents types de neurones, de cellules sensorielles et de synapses) qui joue un rôle dans la modulation de certains comportements de l'animal. Toutefois, le contrôle de la locomotion repose essentiellement sur une communication électrique épithéliale entre cellules ciliées (Tamm 1982), et seulement accessoirement sur la communication nerveuse.

*Pleurobrachia* doit vraisemblablement son nom vernaculaire de « groseille de mer » aux huit rangées longitudinales de palettes natatoires ectodermiques qui parcourent la surface de son corps et qui sont impliquées dans la locomotion de l'animal. Ce sont ces palettes natatoires, les peignes, qui ont donné à l'embranchement le nom de Ctenophora (en grec « qui portent des peignes »). Les peignes (Fig. 4) sont constitués de plusieurs types cellulaires : des cellules épithéliales, des neurones, et les cellules les plus abondantes, les *polster cells*<sup>3</sup>, pouvant porter chacune plus d'une vingtaine de cils très longs (jusqu'à 2 mm chez certaines espèces) (Hernandez Nicaise 1991). La cohésion des cils d'une palette est assurée par des structures intracellulaires appelées lamelles de compartimentation (*compartmenting lamellae*) (cl dans la fig. 4E) (Afzelius 1961). A notre connaissance, les cténaires sont les plus grands animaux à locomotion ciliaire. Sitôt qu'un peigne effectue un battement, il stimule le peigne adjacent du côté oral, de telle sorte que l'onde se propage du pôle aboral vers le pôle oral de chaque rangée de peigne, et que l'animal se déplace avec la bouche en avant.

L'organe apical (Fig. 5A) assure la coordination du battement des huit rangées de peignes auxquelles il est relié par des sillons de cellules ciliées (voir aussi Fig. 2A, et le détail de la connexion entre le sillon cilié et le peigne le plus aboral, Fig. 4C). Au milieu de l'organe apical, un statolithe est soutenu par quatre groupes de cellules ciliées appelées balanciers (Fig. 5A). Une perturbation de la position d'équilibre entraîne une excitation asymétrique des balanciers par le statolithe, et en conséquence un battement différentiel des différentes rangées de peignes. C'est ainsi que l'animal peut retrouver sa position initiale. Les expériences menées par Tamm (1982) sur *Pleurobrachia* montrent que la communication entre l'organe apical et les peignes s'effectue sans transmission nerveuse. Indépendamment de tout stimulus sensoriel, les cils des balanciers sont animés de battements rythmiques qui, transmis par les sillons ciliés, constituent le *pace-maker* du battement des rangées de peignes (Tamm 1982). C'est ainsi que l'animal peut retrouver sa position initiale.

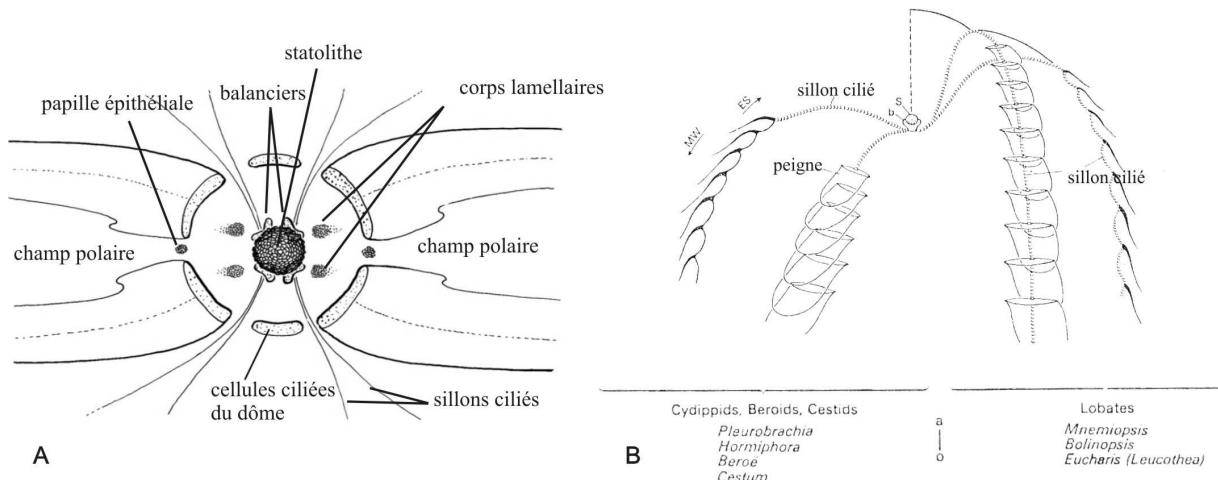
---

<sup>3</sup> En l'absence d'une traduction convenable en français, j'utiliserai ce terme de *polster cell* dans le texte.



**Figure 4.** Eléments concernant la structure et le fonctionnement des peignes. (A) Vue en microscopie électronique à balayage (MEB) de deux peignes successifs. On distingue la partie basale appelée coussinet (bc) au milieu de laquelle émerge la palette (cp) formée de cils (dont l'aspect ébourré est dû à la fixation). (B) Dessin en coupe transversale du peigne. Le coussinet basal est constitué de polster cells (pol) à corps cellulaire allongé et portant les cils de la palette (cp). Le coussinet basal, qui contient aussi des neurones (n), est pourvu d'une couverture de cellules épithéliales (ep). (C) Vue au MEB de la connection entre un sillon cilié (cg) et le premier peigne (c1) à l'extrémité aborale d'une rangée de peignes. (D) Séquence de battement d'un peigne. Au repos, le peigne est plaqué sur le corps et orienté vers le pôle oral. Le mouvement actif (qui propulse l'animal) se fait vers le pôle aboral (de l'état 1 à l'état 7), puis le peigne revient en position de repos en effectuant une ondulation (de l'état 7 à l'état 9). (E) Dessin d'une coupe transversale des cils d'un même peigne, montrant les lamelles de compartimentation (*compartimentating lamellae*) (cl) qui en assurent la cohésion. bc : coussinet basal, c1 : peigne le plus aboral d'une rangée de peignes, cg : sillon cilié, cl : lamelle de compartimentation, cp : palette, ep : épithélium de revêtement du coussinet basal, n : neurone, noy : noyau d'une polster cell, pol : polster cells. Sources : (A) et (C) images originales fournies par Muriel Jager ; (B) d'après Hernandez-Nicaise (1974) ; (D) et (E) d'après Tamm (1982).

Les expériences menées par Tamm (1982) sur *Pleurobrachia* montrent que la communication entre l'organe apical et les peignes s'effectue sans transmission nerveuse. Indépendamment de tout stimulus sensoriel, les cils des balanciers sont animés de battements rythmiques qui, transmis par les sillons ciliés, constituent le pace-maker du battement des rangées de peignes (Tamm 1982). La stimulation par le statolith provoque une augmentation de la fréquence de battement des cils du balancier concerné (peut-être par un influx d'ions calcium), puis des sillons ciliés correspondants, et enfin des peignes. Par ailleurs, lorsque Tamm immobilise - dans le peigne le plus aboral – les cils qui sont en contact avec le sillon cilié, l'intégralité du peigne est alors incapable de battre. Les observations en microscopie à transmission ont révélé que les cellules des sillons ciliés sont liées les unes aux autres par des jonctions communicantes (= jonctions de type gap), suggérant fortement que la transmission de l'influx le long du sillon cilié se fait par conduction électrique épithéliale (ou neuroïde) (Hernandez-Nicaise 1991).



**Figure 5.** Organe apical et communication avec les rangées de peignes. (A) Dessin schématique de l'organe apical. Quatre sillons ciliés partent des balanciers qui portent le statolithe. L'organe apical est flanqué de part et d'autre de deux aires de cellules ciliées appelées champs polaires. (B) A gauche, le sillon cilié s'arrête au peigne le plus aboral : c'est la situation que l'on rencontre chez les « Cydippida », les béroidés, et les cestidés. A droite le sillon cilié se poursuit le long de la rangée de peignes : c'est ce que l'on observe chez les lobés. (A) dessin non publié d'Eric Quéinnec ; (B) d'après Tamm (1982).

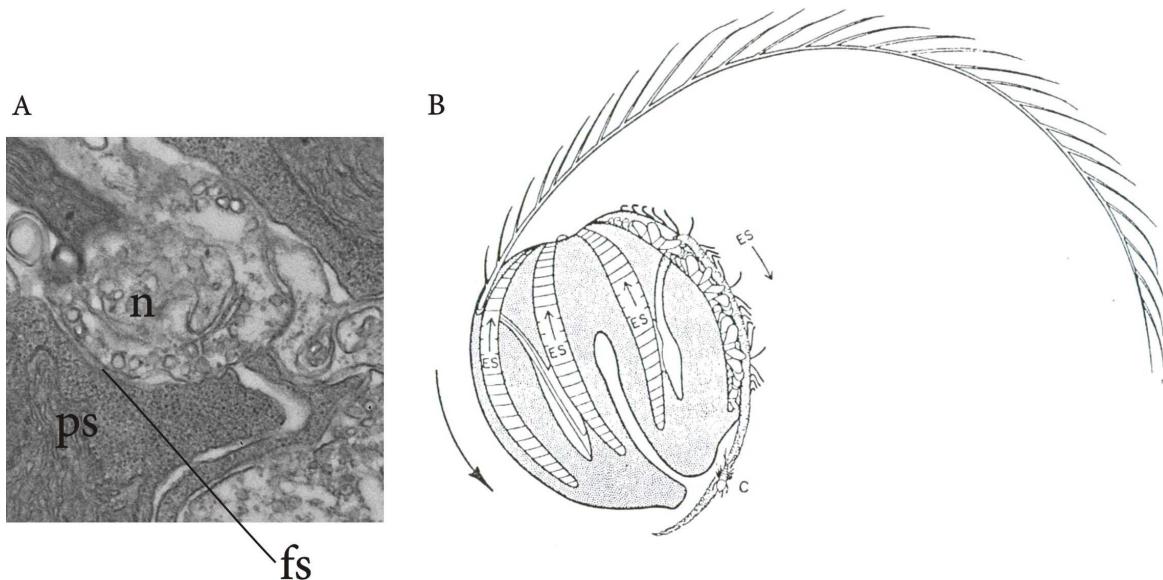
Tamm (1982) montre également que la synchronisation des peignes au sein d'une même rangée n'est pas de nature nerveuse. Lorsqu'il détruit le réseau nerveux entre deux peignes, ou même lorsqu'il arrache un peigne, la propagation du battement n'est pas interrompue. Cette dernière n'est affectée que lorsque plusieurs peignes successifs sont retirés. Il montre ainsi que c'est la perturbation hydrodynamique causée par le mouvement d'un peigne qui entraîne le battement du peigne adjacent : les *polster cells* sont donc vraisemblablement des mécanorécepteurs / effecteurs autonomes<sup>4</sup>. Il est intéressant de noter que chez les cténaires du groupe des lobés, la moindre blessure entre deux peignes adjacents interrompt la transmission de l'onde de battement (Parker 1905, Tamm 1982) : cette différence s'explique par le fait que dans ce groupe, à la différence de ce que l'on observe chez *Pleurobrachia*, le sillon cilié parcourt toute la rangée de peignes, et que la conduction neuroïde en son sein est le médiateur de la synchronisation (Fig. 5B).

Le comportement de nage du cténaire ne se limite pas au maintien de la position d'équilibre, et un certain nombre de stimulations provenant de son environnement (stimulations mécaniques, lumineuses), ou même des changements de son « humeur » (*mood*) peuvent induire des mouvements de nage complexes modulés par le système nerveux (arrêt, demi-tour, nage à reculons, rotation sur lui-

<sup>4</sup> A supposer bien sûr que les *polster cells* soit elles-mêmes responsables de la perception du stimulus mécanique. Dans l'état actuel des données physiologiques, on ne peut pas exclure que d'autres cellules du coussinet perçoivent le stimulus et le transmettent aux *polster cells*.

même...). Par exemple, lorsque l'animal capture une proie sur l'un de ses tentacules, le battement des peignes adjacents au tentacule s'inverse, de sorte que l'animal tourne sur lui-même, ce qui lui permet d'amener à sa bouche son tentacule et sa proie (Fig. 6B). Les expériences électrophysiologiques menées par Tamm montrent que ces modulations particulières du battement des peignes sont sous contrôle du système nerveux. Les études ultrastructurales menées sur le cténaire *Beroe ovata* (Hernandez-Nicaise 1974), ainsi que nos propres observations sur *Pleurobrachia* indiquent que des fibres nerveuses établissent des contacts synaptiques avec les *polster cells* (Fig. 6A).

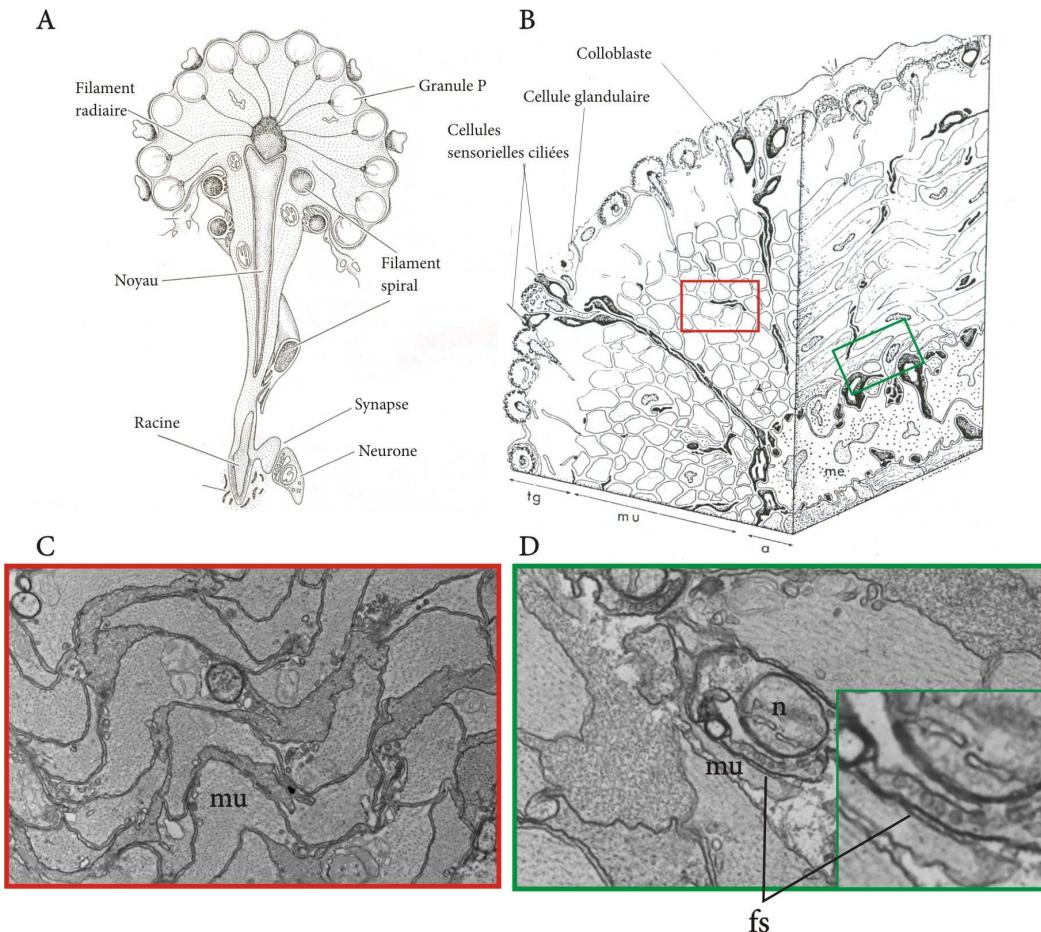
Le système nerveux des cténaires est souvent décrit comme diffus et rudimentaire (Brusca & Brusca 2003). Mais en réalité, une étude d'immunohistochimie réalisée par notre équipe (article 4, Annexe1), sur laquelle je reviendrai plus en détail dans la partie 1.3.2.B, démontre que *Pleurobrachia* possède deux réseaux distincts de neurones. Le premier est en position basi-épithéliale, il est assez dense, polygonal, et ses mailles sont constituées d'une agglomération de neurites. Le second, plus lâche, et dont les mailles sont constituées de neurites isolées, est intra-mésogléen (son origine embryologique n'est pas connue). Le réseau épithélial présente également un certain nombre de condensations associées au complexe aboral, aux peignes, aux tentacules.



**Figure 6.** Contrôle du battement des peignes par le système nerveux. (A) Vue en microscopie électronique d'une synapse entre une fibre nerveuse (**n**) et une *polster cell* (**ps**). (B) Comportement de nage lors de la prise alimentaire : les rangées de peignes qui sont du côté du tentacule qui a capturé la proie inversent le sens de leur battement, de sorte que l'animal tourne sur lui-même. **c** crustacé, **es** battement actif, **fs** fente synaptique, (A) Image MET réalisée par Cyrielle Dayraud ; (B) Tamm (1982).

### 1.1.3. Tentacule et tentilles

*Pleurobrachia* est un animal prédateur macrophage qui capture ses proies à l'aide d'une paire de tentacules. L'appareil tentaculaire contient un axe principal, le tentacule *sensu stricto*, des axes secondaires, les tentilles, et une racine tentaculaire, qui ancre tentacule et tentilles au corps de l'animal (Fig. 2A, B). Tentacule et tentilles sont couvert d'un épithélium comportant diverses cellules (glandulaires, sensorielles) et surtout des cellules adhésives d'un type très particulier propre aux cténaires, les colloblastes (Fig. 7A), servant à la capture des proies.



**Figure 7.** Organisation du tentacule des cténaires. (A) Schéma d'un colloblaste. Le colloblaste est en position ectodermique, et sa partie renflée fait face au milieu extérieur. On y trouve les granules P, connectés par les filaments radiaux au filament spiral ; la nature de ces structures n'est pas connue. Le noyau est de forme allongée. Le colloblaste établit des contacts synaptiques avec le système nerveux. (B) schéma d'un tentacule de « Cydippida », dessiné par M.-L. Hernandez-Nicaise dans sa thèse en 1974. Elle montre un axe mésenchymateux (**me**) contenant notamment un cordon nerveux (en fait il semble qu'il y en ait deux, voir le texte). Ce cordon se ramifie pour contacter les fibres musculaires (**mu**) et les cellules du tégument (**tg**). (C) Vue au MET des l'agencement des cellules musculaires (**mu**) dans un tentacule de *Pleurobrachia pileus*. (D) Vue et détail d'un contact synaptique entre un neurite (**n**) et une cellule musculaire (**mu**) dans le tentacule de *Pleurobrachia pileus*. **fs**, fente synaptique. Sources : (A) Brusca & Brusca (2003) ; (B) Hernandez-Nicaise (1974), (C,D) Images originales, Alexandre Alié et Patrick Chang.

L'épithélium s'organise autour d'un axe mésogléen, composé de neurones et de cellules musculaires (Fig. 7B-D) (Franc 1985). D'après nos observations en immunofluorescence, le tentacule semble posséder deux cordons de cellules nerveuses (connectés entre eux par des projections transverses, voir Fig. 2E et E' de l'article 4 en annexe 1), ce qui contredit les descriptions traditionnelles de la littérature (Hertwig 1880, Hernandez Nicaise 1974). Dans les tentilles, Hertwig (1880) a décrit en coupe transversale une mésoglée constituée de deux masses musculaires entre lesquelles est prise en sandwich une structure fibreuse (appelée *tentacle core* par Hyman 1940), que nos marquages en immunofluorescence nous conduisent à interpréter comme deux cordons nerveux parallèles reliés par des connexions transverses (Figure 51A,E). Ces muscles et ces neurones participent au comportement de prise alimentaire (rétraction du tentacule et des tentilles avant la rotation de l'animal).

Les tentilles ont parfois été qualifiés de ramifications du tentacule (Jager et al. 2008). Il faut manier ce terme avec précaution car il introduit une confusion entre l'organisation et la formation des tentilles. Il est clair que d'un point de vue purement topologique, les tentilles sont des expansions latérales connectées au tentacule. En ce qui concerne leur genèse par contre, nos observations récentes suggèrent, en accord avec les auteurs anciens (Hertwig 1880), que les aires de formation des tentilles et du tentacule sont distinctes au sein de la racine tentaculaire ; donc les tentilles ne se ramifient pas secondairement à partir du tentacule, au contraire, ils s'y connectent secondairement.

#### **1.1.4. La racine tentaculaire, réserve de cellules souches et usine à produire du tentacule et des tentilles**

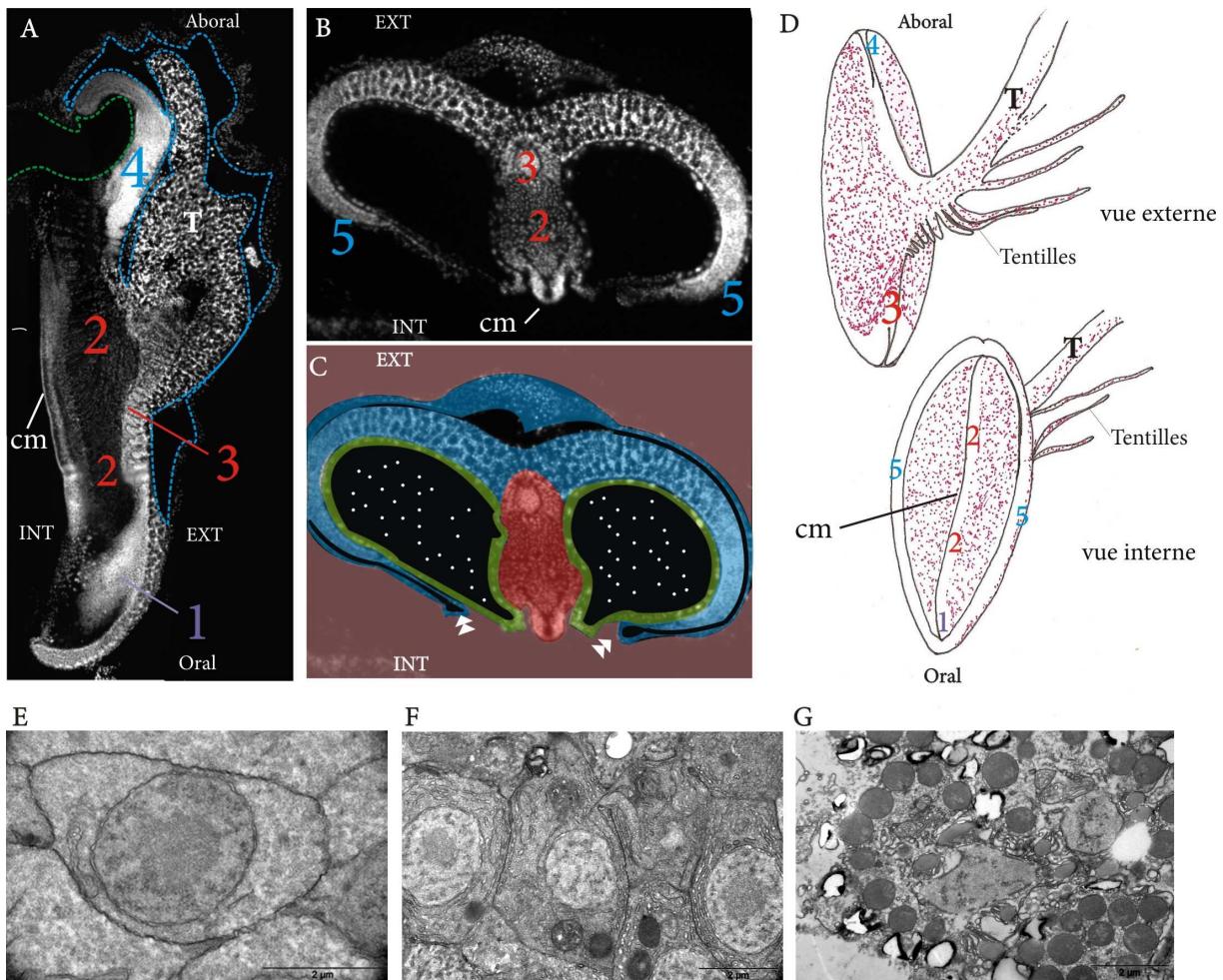
Les tentacules et les tentilles, longs et fragiles, sont régulièrement abimés ou arrachés durant la vie de l'animal. Cependant, ils régénèrent en quelques heures, car la racine tentaculaire est capable de fournir tous les constituants nécessaires à ce processus. Elle est le site d'une constante neurogenèse, myogenèse et épithéliogenèse. La partie 2 de cette thèse, qui comporte un article consacré aux cellules souches de *P. pileus*, porte en partie sur l'expression de gènes et sur la dynamique cellulaire au sein de la racine tentaculaire, dont je vais donner ici quelques éléments d'anatomie.

Positionnée à la base du tentacule, elle est logée dans une invagination de l'ectoderme qui forme une sorte de poche (appelée gaine tentaculaire) (Fig. 2A,B). De forme globalement ovoïde, la racine tentaculaire est allongée dans le sens de l'axe oral-aboral. En coupe transversale, elle apparaît constituée de deux expansions latérales et d'une partie centrale (Fig. 8B) : elle a donc une symétrie bilatérale, et le plan de symétrie qui la partage en deux correspond au plan tentaculaire de l'animal.

La structure interne de la racine est assez complexe, et ses différentes parties ont été décrites par différents auteurs sans jamais faire l'objet d'une étude ultrastructurale globale. En 1880, Hertwig en a fait une description tout de même assez complète, pionnière et très précise pour l'époque, mais sans données ultrastructurales, le premier microscope électronique ayant été inventé cinquante ans plus tard. Benwitz (1978) a décrit la formation des colloblastes chez *Pleurobrachia pileus*. Franc (1985) donne quelques éléments sur la formation de l'axe mésogléen. Aujourd'hui encore, nous n'appréhendons pas totalement l'organisation et le fonctionnement de cette racine, mais sur la base de nos observations chez *Pleurobrachia pileus*, je propose d'y reconnaître cinq parties, différant par leur positionnement et par les structures qu'elles participent à former (Fig. 8A à D): (1) l'extrémité orale, constituée d'une masse de cellules d'apparence homogène, indifférenciées et qui se divisent activement mais dont la destinée n'est pas claire ; (2) une zone intermédiaire interne, le bourrelet médian, site de différenciation des cellules mésogléennes (musculaires et nerveuses) du tentacule *sensu stricto*, et dont une saillie interne (la crête médiane), localisée dans le plan de symétrie de la racine tentaculaire, héberge les cellules souches mésogléennes ; (3) Une zone intermédiaire externe où se forment les tentilles ; (4) Une zone aborale contenant deux masses symétriques de cellules indifférenciées (à noyaux très petits et très denses), qui se divisent très activement, et dont nous suspectons qu'elles pourraient donner les constituants ectodermiques autres que les colloblastes, bien que nous n'en ayons pas de preuves ; et enfin (5) les expansions latérales, ou bourrelets latéraux, qui sont le lieu de formation des colloblastes du tentacule et des tentilles, les cellules souches étant contenues dans la partie distale de ces expansions.

Les expansions latérales sont de nature ectodermique (elle représentent en fait un épaissement de l'épithélium), alors que la partie médiane est mésogléenne. La racine tentaculaire a donc une origine embryonnaire mixte. Elle contient par ailleurs une paire de canaux endodermiques (Figure 8C). A l'heure actuelle, nous ne sommes toujours pas parvenu à identifier la zone de formation des cordons nerveux du tentacule et des tentilles. Nous reviendrons sur ce point dans la partie 3.3. (article 3), qui concerne l'expression d'un marqueur du système cholinergique (CHT) chez *Pleurobrachia pileus*.

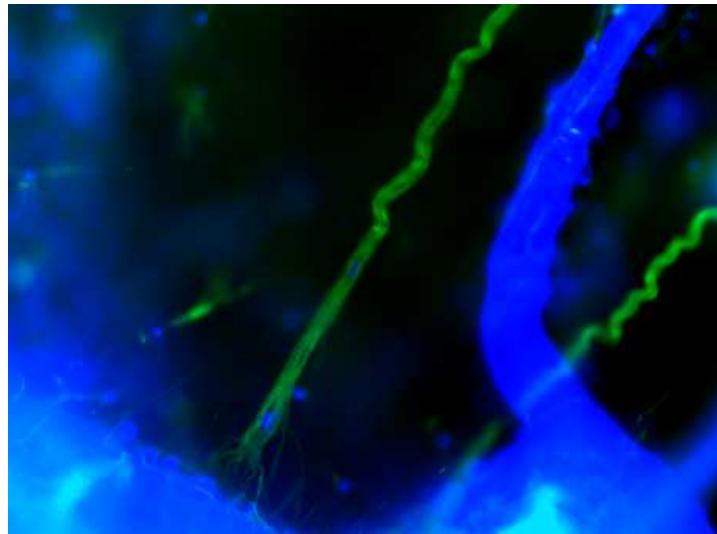
La dynamique cellulaire intense de la racine tentaculaire, et l'existence de populations localisées de cellules souches somatiques, spécialisées du point de vue de leur progéniture (p. ex. colloblastes pour les cellules souches des expansions latérales, cellules de la mésoglée pour celles de la crête médiane) font de la racine tentaculaire un organe particulièrement intéressant pour étudier le fonctionnement des cellules souches, ainsi que la différenciation cellulaire, chez les cténaires.



**Figure 8.** Organisation et fonctionnement de la racine tentaculaire. (A) Marquage au Dapi d'une coupe cryogénique longitudinale (se référer au texte concernant la numérotation des zones). (B) Marquage au Dapi d'une coupe cryogénique transversale de la racine au niveau de la zone de formation des tentilles (zone 3). (C) La même image que (B), sur laquelle sont colorées les différentes zones de la racine en fonction de leur origine embryonnaire. Les canaux endodermiques sont en vert, et leur lumière est matérialisée par les pointillés blancs, la composante mésogléenne de la racine tentaculaire est en rouge, la mésoglée du corps en rose, les expansions latérales de la racine tentaculaire et l'épithélium de la gaine tentaculaire (ectodermiques) sont en bleu, et enfin la cavité de la gaine tentaculaire, en continuité avec l'eau de mer, est en noir. Il faut noter que les expansions latérales sont en continuité avec l'épithélium invaginé de la gaine (doubles têtes de flèches) dont elles constituent une zone spécialisée. (D) Dessins des vues interne et externe de la racine tentaculaire (les points rouges représentent les colloblastes). (E-G) Les différentes étapes de la maturation du colloblaste le long des expansions latérales, ici vues au MET, sont matérialisées par l'accumulation des granules P (denses aux électrons). (E) Cellule souche ou progéniteur indifférencié de colloblaste, localisé à l'extrémité distale de l'expansion latérale. (F) Colloblaste en début de différenciation, dont le cytoplasme contient quelques granules P. (G) Colloblaste différencié. **cm** : crête médiane, **T** : tentacule. (A-C) images originales Alexandre Alié ; (D) dessins originaux Alexandre Alié ; (D-F) Images originales Alexandre Alié et Cyrielle Dayraud, avec la collaboration de Patrick Chang et Sophie Pagnotta.

### 1.1.5. Les cténaires possèdent-ils un mésoderme ?

*Pleurobrachia pileus* est transparent et gélatineux : entre l'ectoderme et l'endoderme non pigmentés (sauf très localement, p. ex. à la surface des coussinets des peignes) se tient la mésoglée du corps, composée en grande partie d'eau et de matrice extracellulaire. Mais on y trouve également des cellules musculaires (Fig. 9), nerveuses et mésenchymateuses diverses (Hernandez Nicaise 1974 ; Franc 1985 ; voir aussi l'article 4 présenté en Annexe 1). Des expériences de traçage des blastomères chez le cténaire *Mnemiopsis* montrent qu'au cours du développement, les muscles mésogléens proviennent d'un lignage cellulaire propre : les micromères oraux, qui s'individualisent lors de la gastrulation (Martindale & Henry 1997a) (voir 1.3.1., Fig. 14). Ceci est analogue à ce que l'on observe par exemple chez le xénope, où les premières cellules du mésoderme s'internalisent au niveau de la lèvre dorsale du blastopore en tout début de gastrulation. A ce titre on peut considérer ce lignage des micromères oraux des cténaires comme mésodermique, et les cténaires comme des animaux triploblastiques – ceci indépendamment du problème de leur position phylogénétique dans l'arbre des métazoaires (Metschnikoff 1885 ; Martindale 2005 ; Derelle & Manuel 2007). Pourtant, dans les ouvrages universitaires de zoologie, les cténaires sont présentés comme diploblastiques (Pearse et al. 1987), ou « *perhaps triploblastic* » (Brusca & Brusca 2003). Il faut toutefois dire que la définition du mésoderme donnée par la plupart des ouvrages de biologie du développement est largement centrée sur les vertébrés. A mon sens cette définition est trop fermée car trop typologique. Elle accorde une place prédominante à l'existence d'un feuillet mésodermique – c'est-à-dire d'une assise cellulaire – mais également à la destinée du mésoderme. On pourra citer comme exemple édifiant la définition de l'ouvrage de Wolpert (1999) : « Mésoderme : feuillet embryonnaire situé entre l'ectoderme et l'endoderme qui donne naissance aux systèmes squelettique et musculaire, aux tissus conjonctifs, à l'appareil circulatoire et à certains organes tels que le rein et les gonades». Selon cette définition, la drosophile par exemple, n'ayant ni squelette ni rein, serait dépourvue de mésoderme. Je pense également que c'est l'attachement à l'idée de feuillet (donc de structure épithéliale) qui pousse les auteurs à employer préférentiellement le terme de « mésenchyme » pour désigner le mésoderme des animaux dépourvus de cœlome, comme par exemple les plathelminthes (Ellis & Fausto-Sterling 1997). En réalité, le mésoderme peut exister sous deux formes : épithéliale (mésothélium) ou mésenchymateuse (comme chez les cténaires et les plathelminthes) (voir aussi discussion dans Hyman 1940 p. 263-267). Ces considérations qui peuvent paraître de pures élucubrations sémantiques ont en réalité une importance fondamentale du point de vue évolutif, car on le verra plus loin, la présence d'un mésoderme chez les cténaires a conduit certains auteurs à les rapprocher des bilatériens, plutôt que des cnidaires (Martindale 2005). La question d'une éventuelle homologie entre le mésoderme des cténaires et celui des Bilateria reste entièrement ouverte.

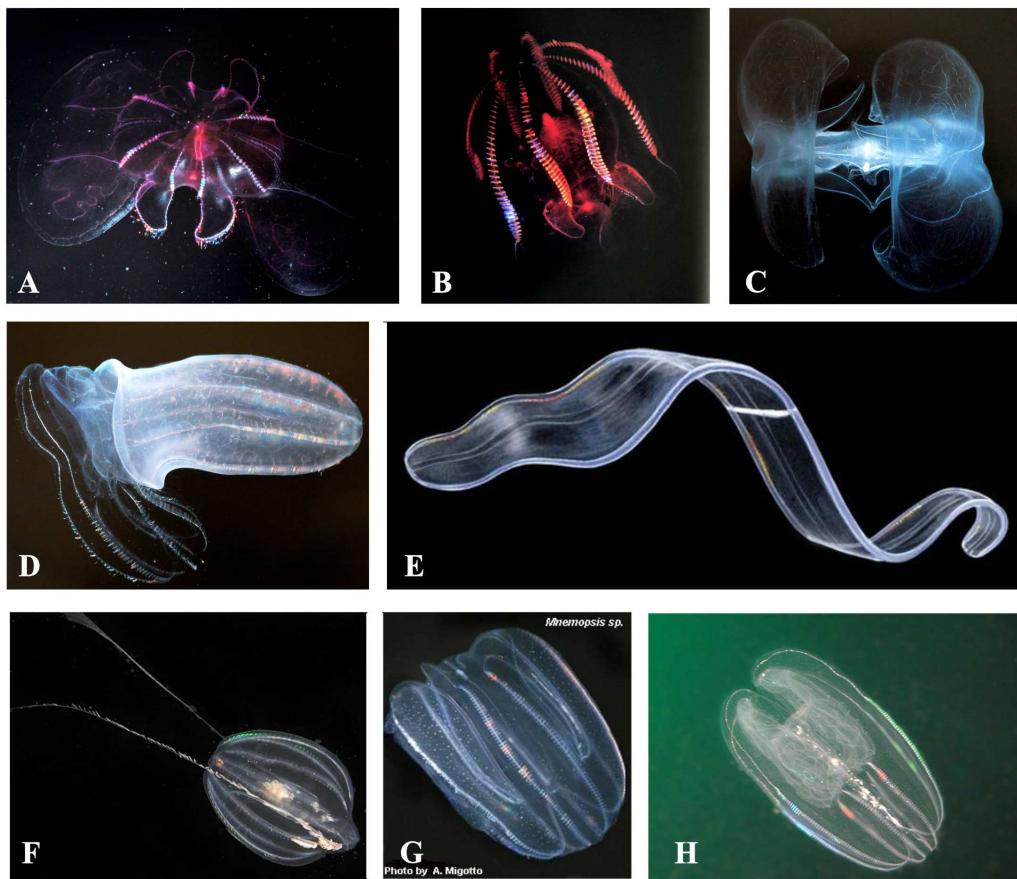


**Figure 9.** Marquage d'une fibre musculaire intra-mésogléene par la phalloïdine (en vert) et le Dapi (en bleu). *Image originale fournie par Cyrielle Dayraud.*

## 1.2. Classification et position phylogénétique des cténaires

### 1.2.1. Classification des cténaires

La monophylie des cténaires est soutenue par toutes les analyses phylogénétiques récentes (p. ex. Podar et al. 2001 ; Philippe et al. 2009). Parmi les synapomorphies morphologiques des cténaires l'on peut citer : les peignes, la symétrie biradiaire, l'organe apical, la larve cydippide (voir plus loin § 1.3.1.), le colloblaste. La morphologie des cténaires est assez variée (Fig. 10). La grande majorité des espèces est planctonique alors que celles de l'ordre des Platyctenida rampent sur le substrat ; certains cténaires mesurent quelques millimètres alors que d'autres peuvent atteindre plusieurs dizaines de centimètres. L'extrême fragilité de ces organismes rend leur récolte et leur fixation, et donc leur étude morphologique, très délicates. C'est surtout le cas des grandes espèces planctoniques qui se désintègrent entièrement lorsqu'elles sont happées par un filet à plancton. Certaines espèces vivent dans les grands fonds et l'on ne connaît d'elles que des photos, mais elles n'ont jamais été récoltées. Une liste complète des noms d'espèces valides est disponible sur la page web éditée par Claudia Mills, de l'Université de Washington (<http://faculty.washington.edu/cemills/Ctenolist.html>) (on y trouve également des liens vers des illustrations de certaines espèces).



**Figure 10.** Diversité morpho-anatomique des cténaires. (A) Une espèce non identifiée. (B) *Lampacteis cruentiventer* (« Cydippida »). (C) *Bolinopsis* sp. (Lobata). (D) *Beroe* sp. (Beroida), avalant un autre cténaire. (E) *Cestum veneris* (Cestida). (F) *Pleurobrachia pileus* (Cydippida). (G) *Mnemiopsis* sp. (Lobata). (H) *Bolinopsis infundibulum* (Lobata). Sources : (A-D) Abysses, Claire Nouvian, Ed. Fayard, Déc. 2006 ; (E) <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/classification/Ctenophora.html#Ctenophora> ; (F) <http://www.seawater.no/fauna/Ribbemaneter/index.htm> ; (G) <http://www.earthlife.net/inverts/ctenophore.html> ; (H) [http://www.infovek.sk/predmety/biologia/metodické/dvojlistovce/dvojlistovce\\_rebrovky.php](http://www.infovek.sk/predmety/biologia/metodické/dvojlistovce/dvojlistovce_rebrovky.php).

La classification des cténaires proposée en 1982 par Harbison et Madin comporte 2 classes : les Nuda constitués d'un seul ordre, celui des Beroida, et les Tentaculata (qui possèdent des tentacules) comprenant 6 ordres (Cydippida, Platyctenida, Cestida, Ganeshida, Thalassocalycida et Lobata) (Harbison & Madin 1982). Mais en 1985, Harbison révise cette classification sur la base notamment de la position de la racine tentaculaire et de l'organisation du système gastrovasculaire. Il propose alors que les Cydippida ne forment pas un groupe monophylétique (Harbison 1985). Il discute par ailleurs de la position des Beroida, qui sont dépourvus de tentacules, et propose deux hypothèses alternatives : dans la première, les Beroida sont apparentés au Haeckeliidae (qui possèdent des tentacules rudimentaires) et ont perdu secondairement leurs tentacules, ce qui est conforme à la vision traditionnelle d'un ancêtre des cténaires ressemblant à un Cydippida, basée sur le fait que la plupart des cténaires possèdent une larve (dite cydippide) morphologiquement assez similaire à un adulte de

Cydippida. Dans le second scénario, Harbison propose que les Beroida sont le groupe-frère de tous les autres cténaires, à la base desquels se branchent les Haeckeliidae. Selon cette hypothèse, qui a la préférence d'Harbison, les tentacules sont apparus secondairement et se sont perfectionnés au cours de l'évolution des cténaires.

La seule phylogénie moléculaire centrée sur les cténaires est une analyse de l'ARN ribosomique 18S de 24 espèces (Fig. 11) (Podar et al. 2001). Elle confirme la paraphylie des Cydippida et par conséquent le caractère plésiomorphe de la présence de tentacules. L'apparentement des Beroidae et des Haeckeliidae est soutenu, mais les relations entre les autres groupes ne sont pas résolues de manière robuste. Ce que montre par ailleurs les phylogrammes présentés dans Podar et al. (2001), comme toutes les autres phylogénies d'ARN 18S incluant des cténaires, c'est que la branche qui mène à leur ancêtre commun est particulièrement longue, alors qu'en comparaison, les branches à l'intérieur du groupe sont relativement courtes. Un tel résultat suggère que l'ancêtre des espèces de cténaires actuelles est relativement récent, et que de nombreuses autapomorphies se sont accumulées sur la branche qui mène à cet ancêtre. Ces deux facteurs rendent particulièrement difficile le positionnement phylogénétique de ce groupe dans l'arbre des métazoaires, comme nous allons le voir maintenant.

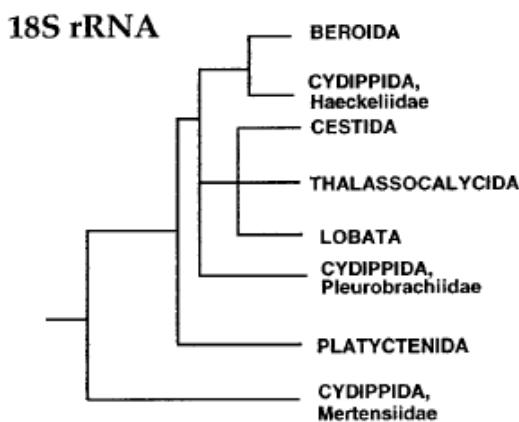


Figure 11. Phylogénie des cténaires, basée sur les analyses de séquences d'ARNr 18S par Podar et al. (2001).

## 1.2.2. Position phylogénétique des cténaires dans l'arbre des métazoaires

La position phylogénétique des cténaires a toujours été – et reste actuellement – très débattue dans la littérature. Je vais maintenant donner un aperçu de l'historique de ce problème, et développer les raisons pour lesquelles je pense que l'hypothèse la mieux étayée actuellement est celle de Philippe et al. (2009), selon laquelle les cténaires sont le groupe-frère des cnidaires, avec lesquels ils forment le groupe des coelenterés.

## A - Pas de consensus d'après les caractères morphologiques

Dès le début du XIX<sup>ème</sup> siècle, et jusqu'au milieu du XX<sup>ème</sup>, les cténaires ont été associés aux cnidaires, du fait de la superficielle ressemblance morphologique des premiers avec les méduses. Dans la classification de Cuvier (1817), quelques genres de cténaires sont classés dans les zoophytes ou radiés, avec les méduses et les anthozoaires. Eschscholtz (1829) crée l'ordre des Ctenophorae que Leuckart (1848) regroupe avec les cnidaires et les éponges dans les Coelenterata. Cent ans plus tard, Hyman (1940) considère que les cnidaires et les cténaires constituent un grade d'organisation plus avancé que les éponges, et les regroupe dans les Radiata (radiés). Le nom de Coelenterata sera aussi utilisé au XX<sup>ème</sup> siècle pour désigner ce même groupe. Selon Hyman (1940) et Komai (1963), les Radiata partagent (i) la symétrie radiaire, (ii) la nature gélatineuse du mésenchyme, (iii) un système nerveux diffus (iv) la structure ramifiée de leur système gastrovasculaire et (v) la présence de statocystes. Néanmoins, nous avons vu précédemment que la symétrie des cténaires est originale car biradiaire, et que le mésenchyme possède des cellules musculaires d'origine endo-mésodermiques qui font défaut aux cnidaires (qui possèdent des cellules myoépithéliales). Parmi les autres caractères attribués aux Radiata, certains sont des convergences évidentes (corps gélatineux et statocystes, tout deux absents ancestralement chez les cnidaires) ou probables (ramification du système gastrovasculaire). D'autres sont des plésiomorphies à l'échelle des eumétazoaires : système nerveux diffus (dont la nature plésiomorphe est rendue vraisemblable par l'absence d'un système nerveux central chez les acoèles, qui pourraient être le groupe-frère de tous les autres Bilateria, Bourlat & Hejnol 2009), absence de cœlome, absence d'« organes » (« *organ systems* » dans le texte de Hyman 1940), absence de système excréteur et d'appareil génital. Il n'existe donc aucune synapomorphie morpho-anatomique convaincante des Radiata ou Coelenterata.

Historiquement, le rapprochement des cténaires et des cnidaires doit également pour beaucoup à deux espèces de cténaires longtemps considérées comme représentant le chaînon manquant entre ces deux groupes. *Haekelia rubra* est un cténaire qui possède des cnidocytes (cellule urticante des cnidaires). Mais il a été montré que ceux-ci proviennent en fait de proies ingérées (Carré & Carré 1980 ; Mills & Miller 1984). *Hydroctena salenskii* possède deux tentacules, des racines tentaculaires, et un organe apical - comme un cténaire - mais aussi un vélum - comme une narcoméduse. En réalité, Nielsen (1987) a montré qu' *Hydroctena* est un cténaire sans aucune affinité particulière avec les cnidaires et que le vélum a été acquis de façon convergente au sein de ces deux groupes.

D'autres auteurs ont associé les cténaires à divers groupes de bilatériens. Par exemple, dans la première édition de son ouvrage de zoologie en 1995 Nielsen les place au sein des Bilateria où il les rapproche des deutérostomiens, du fait de la présence de muscles de nature mésodermique, car dérivant de micromères mis en place au pôle de gastrulation (Martindale & Henry 1997a ; Nielsen

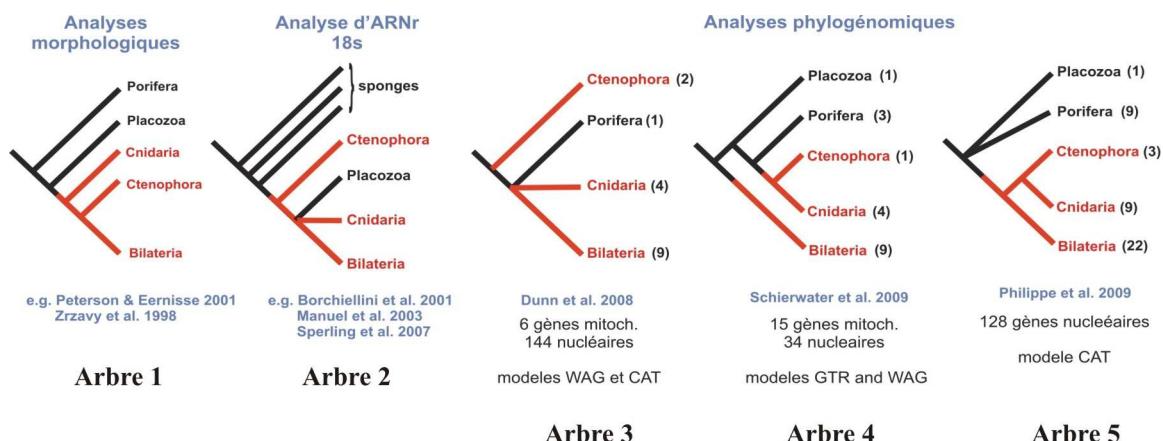
1995). Dans la seconde édition, en 2001, il considère finalement les cténaires comme le groupe-frère des bilatériens (Nielsen 2001). On notera que le texte n'a en substance pas changé entre les deux éditions. Dans d'autres travaux, la présence d'un tube digestif à deux orifices, la présence d'un acosome dans les spermatozoïdes et l'existence supposée de neurones cholinergiques (voir partie 3.3.) ont également été utilisés comme arguments en faveur d'un regroupement (cténaires + bilatériens) (p. ex. Brusca & Brusca 2003 : analyse en parcimonie d'une matrice de 96 caractères morphologiques). Néanmoins, l'homologie respective des bouches et anus de cténaires et de bilatériens n'a jamais été démontrée ; certaines éponges et certains cnidaires possèdent également un acosome (Fell 1997 ; Carré 1984) ; et des résultats non publiés obtenus par une équipe japonaise suggèrent que certains neurones de l'hydre (un polype de cnidaire) seraient cholinergiques (nous reviendrons sur ce point dans la partie 3.3.).

## B - L'ère de la phylogénomique : retour à l'hypothèse traditionnelle des cœlentérés

Les premières phylogénies moléculaires incluant des cténaires apparaissent au début des années 90 (Christen et al. 1991 : ARN 28S, Wainright et al. 1993 : ARN 16S). La quasi-totalité des analyses d'ARN ribosomiques placent les cténaires en groupe-frère d'un clade comprenant cnidaires et bilatériens, et parfois placozoaires (Medina et al. 2001 ; Podar et al. 2001 ; Manuel et al. 2003) (Fig. 12, arbre 2). Mais ce résultat n'est pas soutenu par les indices de robustesse. D'autre part les travaux de Collins (1998) et Kobayashi et al. (1993) montrent que la position des cténaires est sensible à l'échantillonnage et aux méthodes de reconstruction, qui les placent parfois en groupe-frère des éponges calcaires ou de l'ensemble des éponges (Kobayashi et al. 1993 ; Manuel et al. 2003).

Entre les années 2000 et 2005, les phylogénies basées sur des ARN ribosomiques et celles basées sur des gènes nucléaires donnent des résultats contradictoires en ce qui concerne les relations de parenté à l'intérieur des bilatériens. Pour résoudre ces conflits, les auteurs profitent de l'accroissement considérable des facilités de séquençage (notamment des ESTs) et produisent des phylogénies à partir de l'analyse de très grands jeux de données : on entre dans l'ère de la phylogénie sur données génomiques, baptisée phylogénomique (Philippe & Telford 2006). Pour diminuer les artefacts de reconstruction phylogénétique liés aux biais systématiques, et notamment le regroupement artéfactuel des espèces évoluant rapidement (connu sous le nom de *long branch attraction*, Felsenstein 1978), Philippe et Telford (2006) montrent qu'il est nécessaire : (i) d'inclure dans l'analyse non seulement un grand nombre de gènes mais aussi un grand nombre de taxons, (ii) de sélectionner des taxons dont les séquences évoluent lentement, (iii) d'utiliser également des caractères (positions dans les séquences en acides aminés) qui évoluent lentement, (iv) de recourir à un bon modèle d'évolution des séquences, et enfin (v) de limiter la quantité de données manquantes dans la matrice analysée.

En 2008, Dunn et al. publient dans *Nature* une analyse phylogénomique des métazoaires qui fait sensation. Cette analyse, dont l'objectif est de résoudre les relations au niveau des Bilateria (plus particulièrement au sein des Lophotrochozoa) est basée sur 150 gènes nucléaires et 77 taxons. Les arbres présentés placent de façon robuste les cténaires comme groupe-frère de tous les autres métazoaires (Fig. 12, arbre 3). Cette position très hétérodoxe résulte vraisemblablement, de l'aveu des auteurs, d'un échantillonnage faible des taxons extérieurs aux Bilateria : « *This result (...) should be viewed as provisional until more data are considered from placozoans and additional sponges* » (Dunn et al. 2008).



**Figure 12.** Les différentes hypothèses phylogénétiques concernant les nœuds profonds de l'arbre des métazoaires. En rouge sont indiqués les taxons qui possèdent un système nerveux (voir la discussion correspondante dans le paragraphe 1.2.2.C).

En 2009, Hejnol et al., publient une phylogénie incluant les mêmes taxons que Dunn et al. (2008) mais en y ajoutant notamment *Pleurobrachia pileus* et le placozoaire *Trichoplax adherens*. Ils trouvent également les cténaires en groupe-frère des autres métazoaires, corroborant les résultats de Dunn. Mais la quantité de données manquantes dans la matrice analysées est très importante (la matrice complète de 1487 gènes comprend 81% de données manquantes, et certains taxons n'ont que quelques gènes échantillonnés !), ce qui peut rendre sceptique sur la fiabilité de l'analyse.

En 2009 également, Schierwater et al. publient l'analyse d'un jeu de données comprenant des gènes ribosomiques, nucléaires, mitochondriaux, et des caractères morphologiques. Le résultat principal de l'analyse est la monophylie des animaux non-bilatériens : cténaires, cnidaires, éponges et *Trichoplax* (Fig. 12, arbre 4). D'autre part, dans cette étude, les éponges sont trouvées monophylétiques, et les cténaires sont placés en groupe-frère des cnidaires. Mais l'échantillonnage de non-bilatériens est faible, et une réanalyse de ce jeu de données par Philippe et al. (in prep) révèle que les Bilateria

présentent une branche extrêmement longue pour la partie mitochondriale du jeu de données (leur attraction vers la base peut donc expliquer pourquoi les non-Bilateria forment un clade), les gènes alignés ne sont pas tous orthologues, et le jeu de données contient des contaminations, notamment les séquences mitochondrielles d'éponges censées appartenir à différents groupes (calcaires, hexactinellides) sont en fait toutes des séquences de démosponges.

Dans les trois analyses décrites plus haut, les groupes externes choisis sont toujours très distants du groupe interne, par exemple la levure *Saccharomyces* dans Dunn et al. 2008 et Hejnol et al. 2009 ; des algues du groupe des chromalvélolées dans Schierwater et al. 2009. Pour tester l'impact de ces groupes externes distants sur la topologie, Philippe et al. 2009 ont utilisé une stratégie visant à limiter les artefacts de reconstruction : un échantillonnage enrichi en non-bilatériens (22 espèces contre 9 dans Dunn et al. 2008), un pourcentage de données manquantes relativement faible (27%), un modèle d'évolution des séquences site-hétérogène (le modèle CAT), et plusieurs analyses différent par le choix des groupes externes. Ainsi, ils ont montré que plus on enlève les groupes externes distants, moins le positionnement des cténaires à la base de l'arbre est statistiquement soutenu, suggérant que ce dernier est dû à une attraction de longue branche. Parallèlement, les cténaires se positionnent en groupe-frère des cnidaires (clade coelenterés), avec un soutien statistique de 78 % quand le groupe externe contient choanoflagellés et champignons, 93% quand le groupe externe ne contient que les choanoflagellés, et 99% sans groupe externe<sup>5</sup> (Fig. 12, arbre 5 ; Fig. 13). Ce sont les éponges qui se positionnent en groupe-frère de tous les métazoaires et qui forment un groupe monophylétique, et non paraphylétique comme l'ont suggéré pendant des années les analyses de gènes ribosomiques (p. ex. Borchiellini et al. 2001).

En 2010, j'ai collaboré à l'article de Pick et al. (2010) (article 5, Annexe 2) qui reprend la sélection de gènes de Dunn et al. (2008) (différente de celle de Philippe et al. 2009) en corrigeant les erreurs d'alignement, en supprimant une partie des données manquantes et zones d'alignement ambiguës, et en augmentant sensiblement le nombre d'espèces de non-bilatériens (notamment d'éponges). Dans ce travail, nous retrouvons la monophylie des éponges et le positionnement de ce clade en groupe-frère des autres métazoaires, suggérant à nouveau que la position des cténaires groupe-frère des autres métazoaires dans Dunn et al. (2008) et Hejnol et al. (2009) est un résultat artéfactuel. Le positionnement des Cténaires, Cnidaires et Placozoaires avec ce jeu de données n'est pas assez robuste pour être concluant.

---

<sup>5</sup> Ces valeurs sont des bootstraps calculés en méthode bayésienne avec le modèle CAT, et non des probabilités postérieures comme dans la plupart des études utilisant la méthode bayésienne (les probabilités postérieures sont connues pour avoir tendance à surévaluer la robustesse des branches).

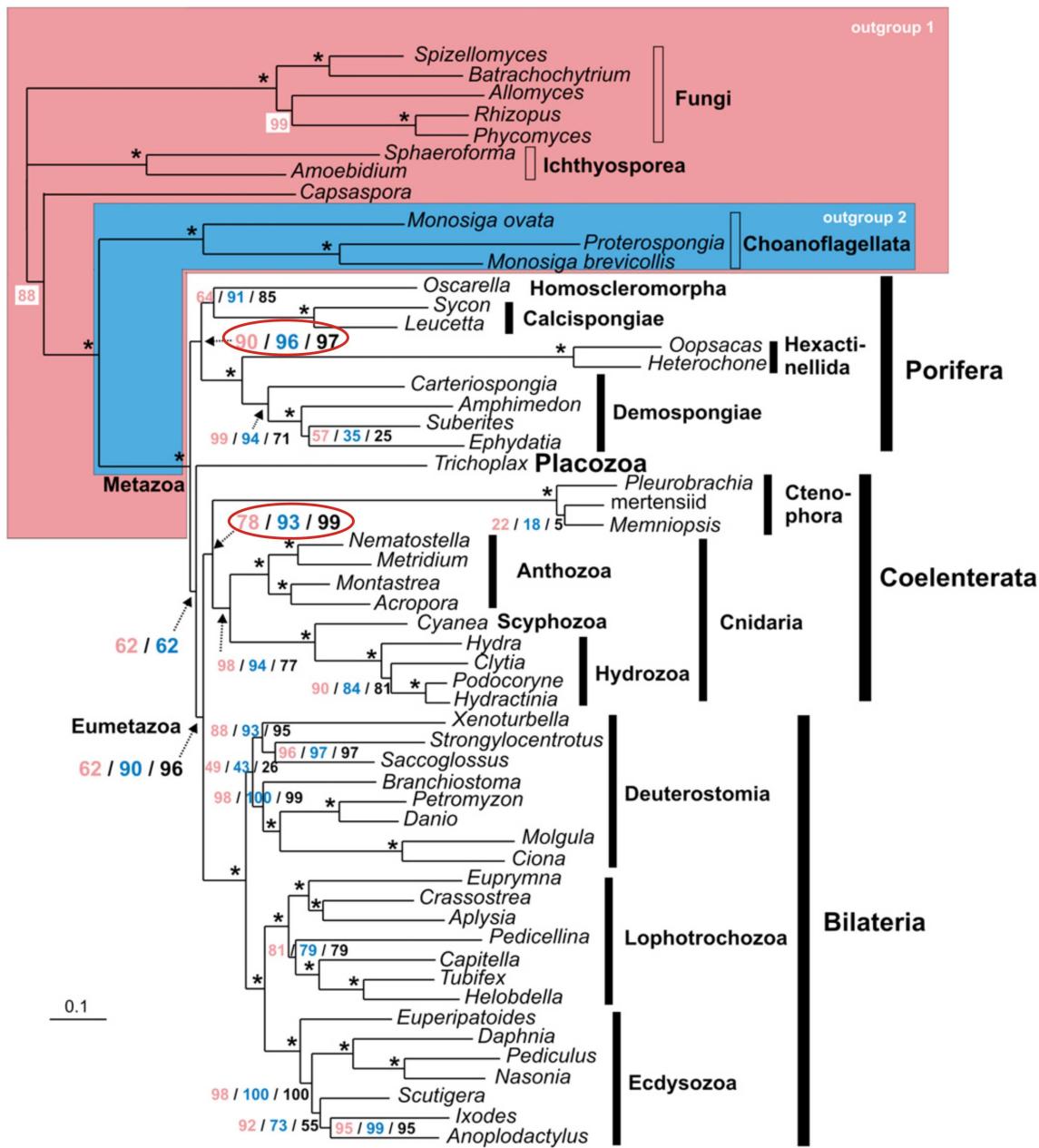


Figure 13. La phylogénie des métazoaires proposée par Philippe et al. 2009, sur la base de l'analyse bayésienne avec le modèle CAT de 128 protéines nucléaires. Sont indiquées les valeurs de bootstraps (100 réplicats) selon que l'analyse a été faite avec le groupe externe complet (en rose) ; ou les choanoflagellés comme seul groupe externe (en bleu) ; ou pas de groupe externe (en noir). Les indices de robustesse correspondant à la monophylie des spongiaires et à la position des cténaires (monophylie des coelenterés) sont entourés en rouge.

Le résultat obtenu par Philippe et al. 2009 rétablit donc le clade des Coelenterata créé par Leuckart il y a plus de 150 ans ; ironie du sort alors qu'Harbison rapprochait les cténaires des bilatériens et écrivait en 1985 : « *it is, to my way of thinking, force of tradition that has kept the Ctenophora and Cnidaria together for so long* ». La morpho-anatomie ne fournit pas de synapomorphie des coelenterés, mais

l’embryologie en fournit potentiellement deux : la présence d’un clivage dit unipolaire (la première division du clivage commence au pôle animal), et le fait que la gastrulation se produit au pôle animal (alors que chez les Bilateria, elle se produit au pôle végétatif).<sup>6</sup>

### C – Impact de la position phylogénétique des cténaires sur les scénarios d’évolution des caractères morphologiques

Comme nous l’avons vu, au cours de ces dernières années, des analyses phylogénétiques basées sur des jeux de données différents et des méthodologies différentes ont fourni des topologies extrêmement disparates pour la base de l’arbre des métazoaires, notamment concernant le positionnement des cténaires (Fig. 12). Ces différentes topologies impliquent des scénarios très différents en ce qui concerne l’évolution de certains caractères morpho-anatomiques clefs. De ce point de vue, la question de l’origine du système nerveux est particulièrement illustrative. Les taxons terminaux possédant un système nerveux sont indiqués en rouge dans la figure 12, et les branches dans lesquels le système nerveux est présent (d’après l’optimisation du caractère « présence / absence de système nerveux » selon le principe de parcimonie) sont également colorées en rouge. Les arbres dans lesquels cténaires, cnidaires et Bilateria forment un clade (eumétazoaires) conduisent à un scénario simple et traditionnel, celui d’une acquisition unique du système nerveux dans la branche des eumétazoaires (Fig. 12, arbres 1, 2 et 5). En revanche, les topologies où les eumétazoaires ne sont pas monophylétiques (cténaires à la base, dans l’arbre 3, ou non-Bilateria monophylétiques, dans l’arbre 4) rendent le caractère homoplasique. Il faut alors admettre deux origines indépendantes du système nerveux, ou bien une acquisition dès la branche commune des métazoaires, suivie d’une ou deux perte(s), chez les spongiaires et les placozoaires (le second scénario, non représenté dans la Fig. 12, est aussi parcimonieux que le premier dans le cas de l’arbre 3, mais moins parcimonieux dans le cas de l’arbre 4). Ainsi, la publication de Dunn et al. (2008) a fait sensation dans la mesure où elle suggérait que le système nerveux des cténaires pourrait avoir été acquis indépendamment de celui de l’ensemble cnidaires + Bilateria. Il est clair que leur repositionnement comme groupe-frère des cnidaires est de ce point de vue beaucoup plus cohérent avec les données morpho-anatomiques. Notons que le caractère « présence ou absence de cellules musculaires » est distribué exactement comme « présence ou absence de cellules nerveuses », et par conséquent la discussion que nous venons d’avoir est transposable aux cellules musculaires.

---

<sup>6</sup> Toutefois, on ne peut pas exclure que ces deux caractères, partagés entre cnidaires et cténaires, soient des plésiomorphies des eumétazoaires.

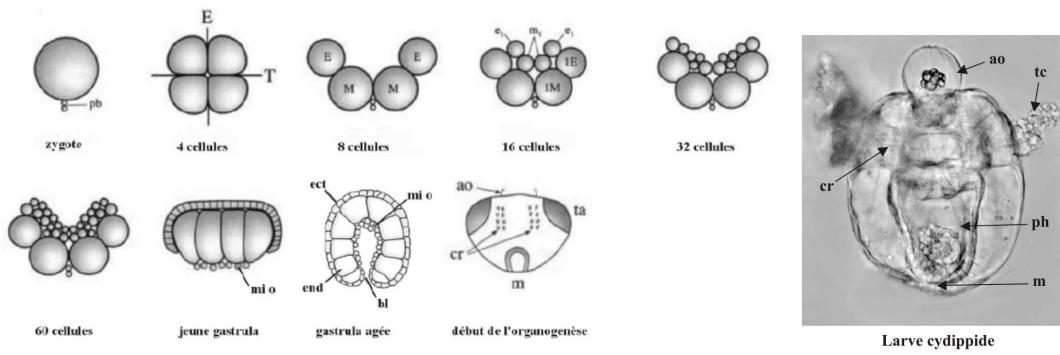
## 1.3. De l'embryologie à l'évo-dévo et à l'anatomie moléculaire

### 1.3.1. Embryologie descriptive et expérimentale des cténaires

Les grandes lignes du développement embryonnaire (assez homogène au sein de l'embranchement) sont décrites dans la Fig. 14. La segmentation (= clivage) de l'oeuf des cténaires est tout à fait particulière et propre à ce phylum (Martindale & Henry 1997a). A l'issue des trois premiers cycles de division, l'embryon comporte huit blastomères inégaux (4 blastomères E situés à l'extérieur et quatre blastomères M situés à l'intérieur). Ces blastomères commencent à émettre des micromères au pôle végétatif (futur pôle aboral) à partir de la quatrième division, et se maintiennent au cours des divisions suivantes sous la forme de 8 gros macromères qui continuent à émettre des micromères. La gastrulation implique d'abord un phénomène d'épibolie (les micromères se mettant à recouvrir les macromères) accompagnée ensuite d'un mouvement d'embolie, c'est-à-dire d'une invagination des macromères. En fin de gastrulation, les macromères se divisent puis émettent chacun un dernier micromère, cette fois-ci au pôle oral (= pôle animal). Ces micromères oraux traverseront l'endoderme pour se placer dans la mésoglée et donner les muscles et le mésenchyme. Dès 1885, Metschnikoff proposait d'interpréter cette formation comme un véritable mésoderme, interprétation confirmée par des études récentes (Martindale et Henry 1999). La mise en place des organes débute avant même que la gastrulation ne se termine, et aboutit seulement 12h après la fécondation à la formation d'une « larve cydippide », capable de se déplacer dans sa gangue (Figure 14, à droite)

L'anatomie de la larve cydippide est très semblable dans les grandes lignes à celle de l'adulte (Fig. 14) : elle possède notamment des rangées de peignes, un organe apical, et se nourrit comme l'adulte en capturant de petites proies à l'aide de ses tentacules (du moins pour les taxons où ces derniers sont présents). On a donc coutume de dire qu'il n'y a pas de métamorphose chez les cténaires.

Néanmoins, les travaux de Jager et al. (2008) montrent que les sites d'expression des gènes de la famille SOX sont sensiblement différents entre la larve et l'adulte. Par exemple le gène *PpiSox6* s'exprime dans la racine du tentacule de l'adulte mais pas de la larve. Ces observations montrent qu'il serait nécessaire d'effectuer des études plus poussées pour établir si de telles modifications d'expression de gènes sont corrélées à d'importants remaniements morphologiques, qu'un manque de connaissances ne nous permet pas d'appréhender en l'état. Par exemple, il serait très intéressant d'observer en microscopie électronique l'évolution de la racine du tentacule depuis la jeune larve jusqu'à l'adulte.



**Figure 14.** Développement embryonnaire des cténaires (pôle animal (oral) en bas). Les plans pharyngien (**E**) et tentaculaire (**T**) sont indiqués dans l'embryon, au stade 4 cellules. Dans les dessins des embryons aux stades 8 et 16 cellules, les lettres correspondent aux noms des macromères (**E, M**) et micromères (**e, m**). **ao** = organe apical, **bl** = blastopore, **cr** = rangées de peignes, **ect** = ectoderme, **m** = bouche, **mi o** = micromères oraux, **ph** = pharynx, **ta** = ébauche des tentacules, **tc** = tentacules. D'après Martindale & Henry (1997a) et Yamada & Martindale (2002) ; photo de la larve cydippide Aldine Amiel.

L'embryologie expérimentale des cténaires trouve son origine à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, lorsque Carl Chun sépare les deux premiers blastomères d'un cténophore et obtient alors deux organismes possédant chacun la moitié des structures d'un adulte normal (Chun 1892). Pendant cent ans, les expériences de dissociation de blastomères menées ensuite par Driesch et Morgan (1895), Fischel (1903) et Freeman (1976, 1977) établissent que la segmentation des cténaires est largement mosaïque : la destinée de chaque blastomère est établie très tôt au cours du développement.

Les expériences de traçage cellulaire, avec de la craie dans les années 60 (Ortolani 1963 ; Reverberi & Ortolani 1963), puis par injection de DiI dans les années 90 ont permis de réaliser une cartographie de la destinée des blastomères au stade 60 cellules du cténaire lobé *Mnemiopsis leidyi* (Martindale & Henry 1997a). La découverte majeure de ces travaux est certainement la confirmation de l'origine mésodermique des muscles mésogléens (déjà décrite par Metschnikoff, 1885), issus des micromères oraux qui se mettent en place pendant la gastrulation. Ces micromères sont issus de la division inégale des macromères qui donnent également des dérivés endodermiques. Les cténaires possèdent donc une lignée endomésodermique, ce qui les différencie fondamentalement des cnidaires (voir toutefois Seipel & Schmid 2006 pour vision différente, selon laquelle des tissus mésodermiques existeraient aussi chez les cnidaires).

Mais le développement de *Mnemiopsis* n'est pas strictement mosaïque. C'est notamment ce que montrent Martindale et Henry (1997b) : alors que les rangées de peignes proviennent des micromères e1 et m1, l'ablation de micromères e1 conduit à la disparition d'un nombre correspondant de rangées de peignes, alors que l'ablation de micromères m1 n'a pas d'effet. D'autre part, en l'absence de micromères e1, les canaux endodermiques placés normalement sous les rangées de peignes (et dérivant des macromères) ne se forment pas non plus. Les micromères e1 ont donc un effet inducteur

vis-à-vis des micromères m1 d'une part, et des macromères E et M d'autre part (Martindale & Henry 1997b ; Henry & Martindale 2001).

### 1.3.2. Les travaux modernes d'évo-dévo sur les cténaires

L'un des objectifs de l'évo-dévo est de chercher à savoir dans quelle mesure les mécanismes de développement embryonnaire affectent les changements évolutifs, et comment les variations dans le développement peuvent conduire à des innovations évolutives (Gilbert & Burian 2003). La conservation des gènes dits « de développement » entre les animaux bilatériens et non-bilatériens a fait l'objet, depuis 2000, de stimulantes publications scientifiques traitant des modifications du plan d'organisation des animaux au cours de l'évolution. Les génomes séquencés de deux cnidaires, l'hydre *Hydra magnipapillata* (Chapman et al. 2010) et l'anémone *Nematostella vectensis* (Putnam et al. 2007), d'une éponge, *Amphimedon queenslandica* (Srivastava et al. 2010), et du placozoaire *Trichoplax adhaerens* (Srivastava et al. 2008) ont ouvert la voie à un flot de publications de génomique comparée et d'évo-dévo sur ces organismes. Parmi les sujets les plus traités on trouve l'origine du système nerveux et sensoriel (par exemple Miljkovic-Licina et al. 2004 ; Sakarya et al. 2007 ; Rentzsch et al. 2008 ; Richards et al. 2008 ; Marlow et al. 2009 ; revue dans Galliot et al. 2009), des axes de polarité (Finnerty et al. 2004 ; Matus et al. 2006 ; Rentzsch et al. 2006, 2007 ; Adamska et al. 2007 ; Momose et al. 2008 ; Saina et al. 2009 ; Chiori et al. 2009 ; revue sur la voie Wnt dans Petersen & Reddien 2009), des cellules souches (Funayama et al. 2010 ; Bosch 2010) et des feuillets embryonnaires, notamment du mésoderme (Spring et al. 2000, 2002 ; Martindale et al. 2004). En somme, l'évo-dévo des non-Bilateria a tendance à être fortement centrée sur les Bilateria et leurs innovations (dont on cherche à comprendre les étapes, ou qu'on cherche à repousser dans le temps) et à peu s'intéresser aux non-Bilateria en eux-mêmes.

L'un des thèmes principaux de l'évo-dévo est l'apparition de nouvelles structures en lien avec les changements spatiaux et temporels de l'expression des gènes de développement et du déroulement des processus développementaux (Gilbert & Burian 2003), comme par exemple la différenciation d'un type cellulaire, l'interaction cellulaire ou encore la prolifération des cellules souches. Toujours élaborée dans un cadre phylogénétique de référence, la démarche en évo-dévo a pour pierre angulaire le concept d'homologie : homologie des gènes dont on compare l'expression, homologie des structures que ces gènes participent à mettre en place. Mais parce que des structures analogues peuvent être mises en place par des gènes homologues, et qu'à l'inverse des structures homologues peuvent impliquer des programmes de développement différents (Moczek 2008), le pont entre homologie des gènes et homologie des structures doit être franchi avec prudence. A mon sens, l'un des pré-requis à tout travail d'évo-dévo est une connaissance approfondie de l'objet d'étude : lorsqu'il s'agit de tester

l'orthologie de deux gènes, cela consiste en une analyse phylogénétique rigoureuse, reposant sur un alignement argumenté ; lorsqu'il s'agit de tester l'homologie de deux structures (ou de deux type cellulaires), les études d'expressions de gènes doivent être accompagnées d'une connaissance profonde de la morpho-anatomie, de l'organisation et de la mise en place de ces structures.

Au titre de leur position phylogénétique en dehors des bilatériens, et au titre de l'originalité de leur organisation, les cténaires constituent pour l'évo-dévo un phylum précieux. Pourtant, les données d'expression de gènes chez les cténaires sont encore relativement rares dans la littérature. A travers le monde, aujourd'hui deux espèces de cténaires font l'objet de ce type d'études : le lobé *Mnemiopsis leidyi* – étudié dans le laboratoire de Mark Martindale à Kewalo (Hawaï, USA) en collaboration avec un groupe de l'Université d'Hokkaido au Japon, et le « Cydippida » *Pleurobrachia pileus* étudié dans notre laboratoire. *Mnemiopsis* fait jusqu'à présent uniquement l'objet de travaux sur le développement embryonnaire et sur la larve, mais comme nous allons le voir, alors que le développement est bien connu dans ses premières étapes, la morpho-anatomie de la larve n'a jamais fait l'objet de travaux de recherches récents et est peu comprise. Le génome complet de *Mnemiopsis leidyi* a été récemment séquencé<sup>7</sup>. Nos travaux sur *Pleurobrachia pileus* portent principalement sur l'organisme adulte, et allient étude d'expression de gènes et analyses morpho-anatomiques en utilisant des outils d'investigation modernes, les études d'expression de gènes au cours du développement embryonnaire étant en revanche peu développées dans notre équipe. Nous disposons d'importantes données transcriptomiques sur *Pleurobrachia pileus* (36 000 ESTs séquencés en 5' par la méthode de Sanger, au Genoscope ; et un run complet en 454 de transcriptome tous stades, réalisé pour notre équipe par GATC en juillet 2010), mais pour le moment nous n'avons pas de données génomiques.

## A - Les travaux sur *Mnemiopsis leidyi*

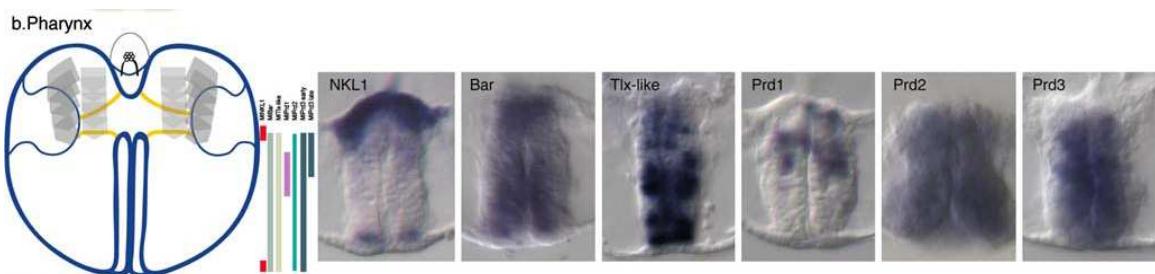
Le premier article montrant une hybridation *in situ* sur un cténaire est celui de Yamada & Martindale (2002) dans lequel ils étudient l'expression du facteur de transcription Forkhead, dans l'embryon et la larve de *Mnemiopsis leidyi*. Quatre autres études sont parues depuis sur *Mnemiopsis*, portant sur l'expression d'un ensemble de gène du groupe des T-box, dont le célèbre *Brachyury* (Yamada et al. 2007), sur l'analyse fonctionnelle de *Brachyury* (Yamada et al. 2010), sur l'expression d'un ensemble de gènes à homéoboîtes des classes Antennapedia et PAIRED (Pang & Martindale 2008), ainsi que, tout récemment, une étude portant sur l'expression de différents composants de la voie Wnt au cours

---

<sup>7</sup> Une première étude, portant sur l'analyse exhaustive des homéodomaines, vient d'être publiée (Ryan et al. 2010).

du développement embryonnaire, travail remarquable par la qualité des *in situ* et la quantité de gènes analysés (Pang et al. 2010). Dans ces différents articles, les auteurs soulignent la portée évolutive de leurs résultats. Par exemple, les données d'expression et d'analyse fonctionnelle de *Brachyury* suggèrent de manière convaincante que ce gène a une fonction conservée dans la régulation des mouvements morphogénétiques à l'échelle des eumétazoaires (Yamada et al. 2007, 2010).

Le modèle *Mnemiopsis* se révèle très adéquat pour l'étude des aspects moléculaires du développement embryonnaire des cténaires, avec des *in situ* d'une qualité indéniable, et la mise au point d'outils expérimentaux permettant de tester les fonctions des gènes (Yamada et al. 2010). Toutefois, ces études présentent une certaine faiblesse du point de vue de la caractérisation précise des territoires d'expression des gènes, par manque de données sur la morpho-anatomie de la larve cydippide (voir la légende de la figure 15 pour un exemple discuté). Enfin, *Mnemiopsis* se prête mal aux études d'expression chez l'adulte car ce dernier, comme tous les membres de l'ordre des lobés, est extrêmement fragile et se disloque complètement lorsqu'on le place dans une solution fixatrice.

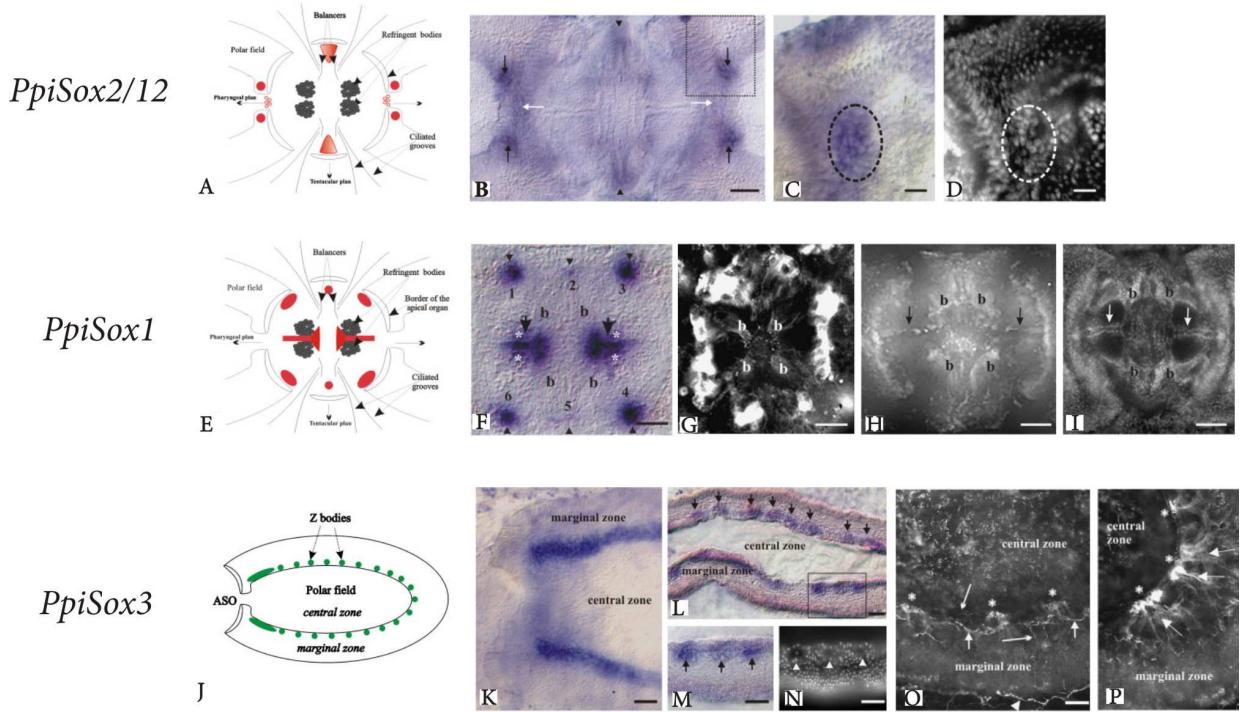


**Figure 15.** Expression dans l'embryon de *Mnemiopsis leidyi* de gènes à homéoboîte de la classe ANTP (*NKL*, *Bar*, *Tlx-like*), et de la classe PAIRED (*Prd2* et *Prd3*) (les relations d'orthologie avec les gènes de bilatériens sont en fait loin d'être claires d'après la figure 2 de Pang & Martindale, 2008). L'expression de ces gènes dans des domaines qui se superposent en partie conduit les auteurs à proposer qu'ils aient un rôle dans le patterning oral/aboral du pharynx. Mais il est tout aussi envisageable qu'ils soient impliqués dans la différenciation de différents types cellulaires, ce qui est difficile à déterminer en l'absence de données sur la nature et la distribution de ces derniers à ce stade de développement. L'expression des gènes *Tlx-like* et *Prd1* en « patches » évoque d'ailleurs plutôt une telle situation. *D'après Pang & Martindale (2008)*.

## B - L'adulte de *Pleurobrachia pileus* : entre évo-dévo et anatomie moléculaire

Les travaux réalisés dans notre équipe sur le cténaire *Pleurobrachia pileus* portent très majoritairement (bien que non exclusivement) sur l'organisme adulte, et cela pour deux raisons: (i) parce que nous nous intéressons à l'évolution des types cellulaires, et au lien entre certaines familles de gènes et les types cellulaires dans lesquels ils sont exprimés. Il est plus facile pour cela de travailler sur l'adulte, dans lequel les types cellulaires sont plus facilement reconnaissables et bien localisés ; (ii) parce que nous nous intéressons aux cténaires adultes en eux-mêmes, c'est-à-dire à leur organisation,

ainsi qu'aux processus de type développemental (liés aux polarités, aux lignages cellulaires et à leur dynamique, à la régénération...) qui se déroulent dans l'adulte.



**Figure 16.** Expression de *PpiSox2/12*, *PpiSox1* et *PpiSox3* dans la région aborale de *Pleurobrachia pileus*. (A-D) Les gènes *PpiSox2* et *PpiSox12* (aux patterns d'expression identiques) sont notamment exprimés en quatre zones de la région proximale des champs polaires. Ces cellules ont été identifiées comme étant des cellules souches (voir article 1). (E-I) *PpiSox1* s'exprime, entre autres sites, en deux zones en forme de T dans le plan pharygien de l'organe apical. **b** balanciers. Les marquages avec l'anticorps anti- $\alpha$ -tubuline tyrosylée YL ½ (panel H) et en Dapi (panel I) révèlent que ce marquage correspond à deux rangées de cellules ciliées. Elles pourraient correspondre à des cellules « oscillantes » décrites en 1880 par Chun. (J-P) *PpiSox3* est exprimé dans des structures probablement sensorielles alignées dans la partie marginale des champs polaires, les corps Z (flèches sur les panels L, M et N, astérisques sur O et P). L'image N est un marquage au Dapi ; les images O et P sont des marquages immunofluorescents avec l'anticorps anti- $\alpha$ -tubuline tyrosylée YL1/2). Adapté de Jager et al. (2008).

A titre d'exemple, un article publié en 2008 (Jager et al. 2008) porte sur l'expression de gènes de la famille SOX dans la larve et l'adulte de *Pleurobrachia pileus*. La démarche de cet article consiste d'abord à décrire les cellules exprimant ces gènes avec le plus de précision possible, parfois en s'aidant de marquages immuno-histochimique (pour les cellules nerveuses par exemple) ou de marquage des noyaux au Dapi (Fig. 16). Les patterns d'expression observés présentent souvent une complexité qui dépasse ce qu'on aurait attendu d'après les connaissances morpho-anatomiques (p. ex. dans le cas de l'expression de *PpiSox1* dans l'organe apical, Fig. 16). Les efforts réalisés pour les interpréter impliquent alors un retour sur la morpho-anatomie qui peut amener à découvrir de nouvelles structures (cas des corps Z, condensations neurales au sein des champs polaires découverts en analysant le pattern du gène *PpiSox3*, Fig. 16). Au-delà des éventuelles implications à grande

échelle évolutive (p. ex., dans le cas de ce travail sur les SOX, sur l'origine de certains mécanismes moléculaires liés aux cellules souches et aux cellules neuro-sensorielles), ce type de données fait progresser notre connaissance des cténaires du point de vue de ce qu'on pourrait appeler « l'anatomie moléculaire ». Les patterns d'expression de gènes constituent en effet en eux-mêmes des caractères ; ils représentent une échelle de description morphologique de l'animal à laquelle les anciens zoologistes n'avaient pas accès. En même temps, ce type de données constitue un socle pour de futures études d'anatomie moléculaire comparée entre taxons de cténaires.

Toujours dans cet esprit, et en écho aux résultats de l'article sur les gènes SOX (Jager et al. 2008), le système nerveux de *Pleurobrachia pileus* a fait l'objet d'une étude détaillée en immunohistochimie (Jager & Chiori 2010 ; article 4 en annexe 1). Bien que les monographies du XIX<sup>e</sup> siècle donnent un bon aperçu de l'organisation générale, et les travaux de microscopie électronique des années 70-80 de fiables données ultra-structurales, la connexion entre ces deux sources d'information est souvent difficile à établir. Le problème est de localiser les types cellulaires dans l'organisation générale de l'individu. Dans l'article proposé en annexe, nous avons choisi d'utiliser des outils nouveaux (en tout cas en ce qui concerne les cténaires) pour remédier à ce problème : marquages à l'aide de différents anticorps, certains dirigés contre des neurotransmetteurs ; marquage des noyaux au Dapi ; marquage de l'actine par la phalloïdine. Cette approche a permis d'améliorer considérablement notre connaissance de la neuro-anatomie de *Pleurobrachia pileus*.

Par exemple, au niveau de l'organe apical, il a été possible de localiser avec plus de précision des structures déjà décrites (les papilles épithéliales, les corps lamellaires...) et d'en identifier de nouvelles. De nouvelles structures ont également pu être mises en évidence au niveau des champs polaires (p. ex. les corps Z et leurs connexions, le muscle associé au champ polaire). Par ailleurs, nous avons également pu établir que les neurones mésogléens constituent un réseau, bien distinct du réseau épithelial. En contradiction avec les données de la littérature, nous avons mis en évidence que le tentacule comporte non pas un, mais deux cordons nerveux. Les résultats suggèrent également pour la première fois l'existence de sous-populations neuronales utilisant des neuropeptides comme neurotransmetteurs. Cet article, actuellement accepté avec modifications mineures dans la revue *Journal of Experimental Zoology (series B : Molecules, Development and Evolution)* illustre bien le fait que, contrairement à une idée répandue de complexification progressive du plan d'organisation au cours de l'évolution des métazoaires, les cténaires possèdent une morpho-anatomie remarquablement sophistiquée.

En conclusion de cette partie, l'intérêt des cténaires provient tout aussi bien de leur pertinence pour aborder des questions évolutives à grande échelle taxonomique chez les métazoaires, que des nombreuses particularités de leur morpho-anatomie et de leur biologie. Dans le cadre de mon travail

de thèse, j'ai mis à profit les avantages offerts par le modèle *Pleurobrachia pileus* pour envisager certains aspects de l'évolution des cellules souches (partie 2) et des cellules neuro-sensorielles (partie 3).

# 2

## Analyse critique du concept de cellule souche et recherche d'une signature moléculaire ancestrale

En première approximation, le concept de cellule souche paraît simple : il s'agit d'une cellule capable à la fois de s'autorenouveler et de donner des cellules qui se différencient (Fig. 17). Toutefois, lorsque l'on entame la lecture d'un article sur les cellules souches, on a toutes les chances de tomber sur une définition qui, en fonction des auteurs et du sujet de l'article, insiste sur telle ou telle autre caractéristique de ces cellules. Ce peut être par exemple leur capacité à se maintenir sur le long terme (durant toute la vie de l'organisme). “*A key feature of tissue stem cells is their ability to perpetuate and maintain their population over the life span of the organism*” peut-on lire à propos des cellules souches de spermatozoïdes chez les mammifères, dans Simon & Frisén (2007). Parfois, c'est davantage la capacité de ces cellules à se diviser de façon asymétrique qui est mise en avant, par exemple à propos des cellules souches nerveuses de drosophile : « *Stem cells have the remarkable ability to give rise to both self-renewing and differentiating daughter cells.* » (Choksi et al. 2006). Enfin, d'autres auteurs insistent sur la propension des cellules souches à donner des dérivés de plusieurs types, c'est-à-dire la multipotence (voir Glossaire) : « *Stem cells by definition have the ability to reproduce and generate new stem cells indefinitely and have the capacity to develop (differentiate) into a large number of different cell types* » (Alkatout & Kalthoff 2007).

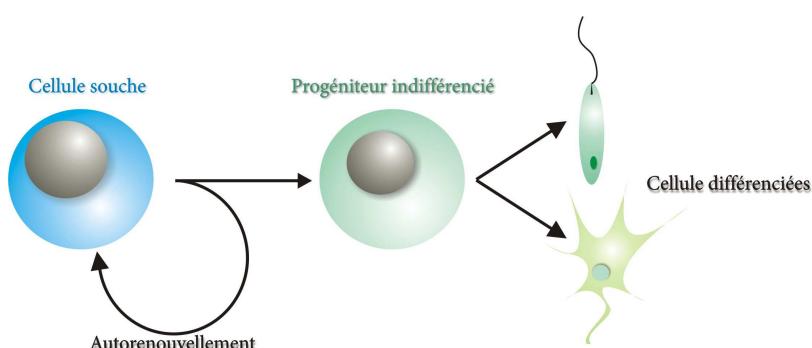


Figure 17. Schéma illustrant le concept de cellule souche. *Figure originale.*

Peut-on arriver à une définition consensuelle de la cellule souche ? Que cachent les différences de définition à travers l'énorme littérature sur le sujet<sup>8</sup> ? Pour décrire les cellules souches sans tomber dans une démarche essentialiste, j'ai choisi pour commencer ce chapitre de dresser le portrait de quatre exemples bien connus et documentés de la littérature, choisis parmi les modèles classiques de biologie du développement, mammifères (la souris et l'humain), et drosophile. A travers ces exemples, j'entends montrer que le concept même de cellule souche est à géométrie variable car l'on est bien en peine de répondre à la question : que partagent entre elles ces cellules souches, et qui n'existe pas dans d'autres catégories de cellules ?

Nous verrons par exemple que toutes les cellules souches ne sont pas multipotentes. D'autre part, les mécanismes qui régulent leur division et leur maintien (par exemple la voie de signalisation BMP, la régulation du cycle cellulaire, ...) sont utilisés dans de nombreux autres contextes. Ensuite, à travers les exemples choisis, il apparaît que l'idée de division asymétrique est un concept fourre-tout qui cache une grande diversité dans les modalités de sa réalisation. Enfin, les gènes (facteurs de transcription, régulateurs post-transcriptionnels) qui confèrent l'identité d'une catégorie de cellules souches donnée n'ont pour la plupart pas de rôle conservé entre les différentes catégories de cellules souches d'une même espèce, et encore moins à des distances phylogénétiques importantes. A la lumière de cette hétérogénéité, on se demandera alors si la cellule souche constitue un type cellulaire à part entière, et si les différentes cellules souches rencontrées à travers l'arbre des métazoaires sont homologues.

Cependant, des modèles d'études nouveaux viendront peut-être au secours du concept de signature moléculaire des cellules souches. Les urochordés coloniaux, les planaires, les acoèles, les cnidaires et les éponges possèdent des cellules souches multipotentes qui expriment toutes des orthologues des gènes *Vasa*, *Piwi*, *PL10*, *Bruno* (initialement découverts chez la drosophile pour leur rôle dans le plasme germinal). Les résultats que nous avons obtenus sur les cellules souches somatiques du cténaire *Pleurobrachia pileus* nous donnent à penser que ces gènes pourraient entrer dans une « signature moléculaire » ancestrale des cellules souches. C'est l'idée que nous avons développée dans l'article qui accompagne ce chapitre (Article 1).

---

<sup>8</sup> Avec le mot clef « stem cell », PubMed propose 251 350 articles. En comparaison, le mot clef « ctenophore » en donne 156 !

*Glossaire : définition des termes « totipotent », « pluripotent », « multipotent » et « unipotent ». Selon le Regenerative Medicine Glossary 2009*

**Nullipotent = Unipotent :**

“Having the ability to develop into only one cell type” (pouvant donner un seul type cellulaire)

**Multipotent :**

“Having the ability to develop into a limited number of cell types” (pouvant donner un nombre limité de types cellulaires)

**Pluripotent :**

“Having the ability to develop into all types of cells, except extra-embryonic tissues” (pouvant donner tous les types cellulaires, sauf les annexes extra-embryonnaires)

**Totipotent :**

“Having the ability to develop into all types of cells including extra-embryonic tissues” (pouvant donner tous les types cellulaires, y compris les annexes extra-embryonnaires)

La distinction entre « pluripotent » et « totipotent » ne concerne finalement que les amniotes, qui possèdent des annexes extra-embryonnaires. Dans la cadre de cette thèse, je n’emploierai « pluripotent » que pour parler des cellules ES de mammifères. Dans tous les autres cas, j’emploierai « totipotent » pour des cellules qui peuvent donner tous les types cellulaires d’un organisme, et « multipotent » pour celles qui peuvent en donner plusieurs, mais pas tous

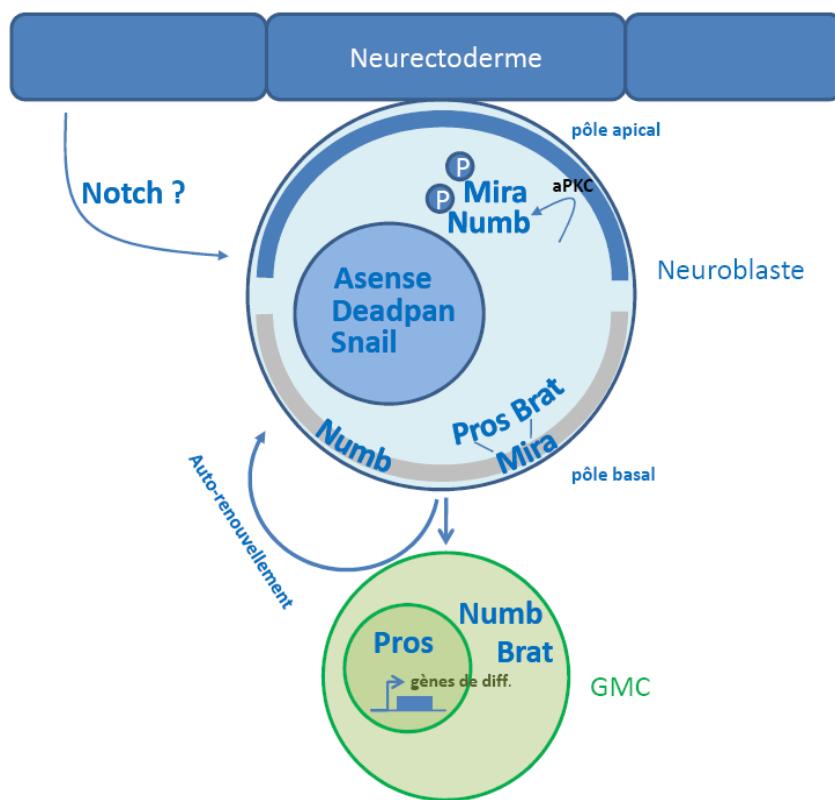
## 2.1. Disparité et unicité des cellules souches chez les modèles classiques de bilatériens

### 2.1.1. Le neuroblaste larvaire de drosophile : une division intrinsèquement asymétrique

Les neuroblastes de la larve de drosophile sont des cellules souches multipotentes. Ils proviennent du neurectoderme et effectuent plusieurs divisions asymétriques, leur permettant de se renouveler tout en produisant des cellules appelées GMC (pour *Ganglion Mother Cells*), lesquelles vont donner des neurones et des cellules gliales du système nerveux central. Le neuroblaste reste en contact avec le neurectoderme, de sorte qu'il est polarisé : le neurectoderme est du côté apical, alors que la GMC se forme du côté basal (Fig. 18).

A cette asymétrie topologique correspond une asymétrie intrinsèque de l'identité moléculaire des deux pôles de la cellule, qui fait du neuroblaste le cas d'école d'une cellule souche se divisant de façon intrinsèquement asymétrique. Au pôle basal, le cortex du neuroblaste contient des protéines qui lors de la mitose rejoignent la GMC. Parmi ces protéines l'on peut en citer trois principales : le facteur de transcription à homéodomaine Prospero (Pros), qui entre dans le noyau de la GMC (Choksi et al. 2006) ; la protéine Numb, connue pour inhiber la voie Notch lors de la différenciation des neurones

dans les organes sensoriels de la drosophile (Sanes et al. 2000) et Brain tumor (Brat), régulateur post-transcriptionnel (Lee et al. 2006a). Ce sont des suppresseurs de tumeur, ce qui signifie que dans les drosophiles mutantes pour ces gènes, les neuroblastes prolifèrent de façon anormalement symétrique, sans entrer en différenciation (Li & Vaessin 2000 ; Lee et al. 2006b ; Lee et al. 2006b ; Betschinger et al. 2006). Du côté apical du neuroblaste, ces gènes sont exclus du cortex par la kinase aPKC (pour *atypical phospho-kinase C*), qui phosphoryle Numb et Miranda, nécessaires à l’ancrage de Brat et Pros (revue dans Prehoda 2009).



**Figure 18.** La division asymétrique du neuroblaste larvaire de drosophile. L’asymétrie entre la « ganglion mother cell » (GMC) et le neuroblaste est assurée par la ségrégation asymétrique de Numb, Pros et Brat. La phosphorylation de Numb et Miranda les exclut du cortex apical. Les facteurs de transcription Asense, Deadpan et Snail sont des marqueurs du neuroblaste. Enfin, le neurectoderme pourrait intervenir dans l’asymétrie de la division par l’intermédiaire de Notch. *Figure originale.*

Pour que cette distribution asymétrique se traduise par une ségrégation différentielle lors de la mitose, il faut que le fuseau mitotique soit orienté parallèlement à l’axe apico-basal du neuroblaste. La kinase Aurora-A est candidate pour cette fonction car chez les drosophiles mutantes pour ce gène, la distribution basale de Numb et l’orientation du fuseau mitotique sont perturbées, conduisant à une prolifération des neuroblastes (Lee et al. 2006a).

Outre ces éléments intrinsèques, certaines données suggèrent que des facteurs extrinsèques pourraient également intervenir dans le bon déroulement de la division asymétrique du neuroblaste. Par exemple le contact avec le neurectoderme est impliqué dans l'orientation du fuseau mitotique (Siegrist & Doe 2006). Un point important concerne la voie Notch. On connaît bien le mécanisme d'inhibition latérale impliqué dans la régulation des gènes proneuraux lors de la spécification des neuroblastes (l'activation de Notch par Delta inactive les gènes proneuraux). On sait également que l'inhibition de Notch par Numb contrôle la destinée neurale des cellules en différenciation. Enfin, Notch est impliqué dans le passage de la division symétrique des cellules neuro-épithéliales à la division asymétrique des neuroblastes (Egger et al. 2010). Or, en 2005, Almeida & Bray ont montré que la mutation de Notch n'a aucun effet sur la dynamique des neuroblastes (Almeida & Bray 2005). Si Notch a un rôle dans l'asymétrie du neuroblaste, cela reste donc encore à démontrer.

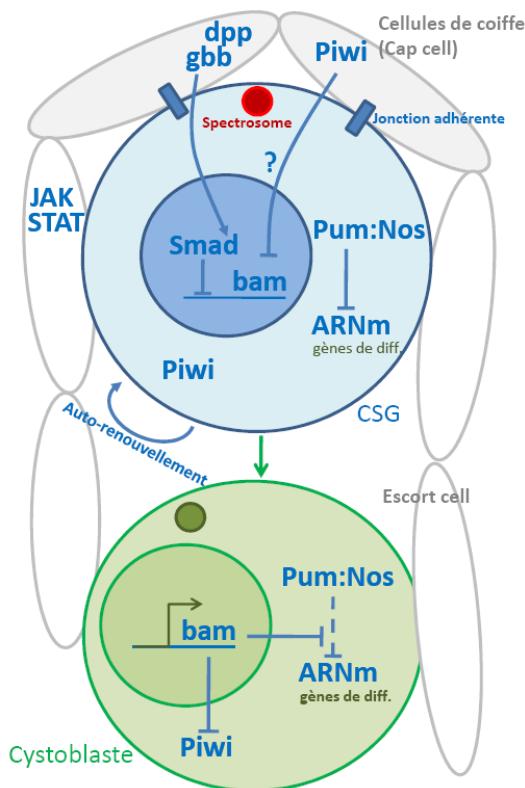
Enfin, un certain nombre de facteurs de transcription localisés dans le noyau du neuroblaste lui-même en constituent la signature transcriptionnelle (Southall & Brand 2009). Parmi eux l'on trouve les gènes de la famille des bHLH *Asense* et *Deadpan* (Wallace et al. 2000), ainsi que le facteur de transcription à doigts de zinc *Snail*. Dans des drosophiles mutantes pour *Prospero*, les GMC ne se différencient pas en neurone mais prolifèrent de façon symétrique et expriment *Deadpan* de façon ectopique (Choksi et al 2006). *Snail* quant à lui est impliqué dans l'orientation du fuseau mitotique (Cai et al. 2001).

### 2.1.2. La cellule souche germinale de la drosophile femelle : sous contrôle de la niche

L'ovogenèse de la drosophile se déroule continuellement pendant la vie adulte de l'animal, à l'extrémité antérieure de chaque ovariole. Dans le germarium résident deux ou trois cellules souches germinales unipotentes. Elles se divisent de façon asymétrique pour s'auto-renouveler tout en donnant un cystoblaste, lequel s'engage dans la gamétogenèse (Fig. 19). Mais lorsque l'une des cellules souches est détruite, les autres peuvent également réaliser une division symétrique pour la remplacer (revue dans Morrison & Kimble 2006). Les cellules souches sont localisées dans une niche de cellules somatiques, à laquelle elles sont ancrées par des jonctions adhérentes, et qui procure un environnement favorable à leur maintien (Song et al. 2002). La CSG de drosophile est l'exemple type d'une cellule souche dont l'asymétrie de la division est contrôlée par des facteurs extrinsèques provenant des cellules de la niche.

Plusieurs voies de signalisation dont les ligands sont sécrétés par la niche contrôlent l'auto-renouvellement des CSG. Ainsi, lorsque la voie JAK/STAT est inhibée par mutation thermo-sensible du gène *Stat*, le stock de CSG s'épuise, faute d'auto-renouvellement (Decotto & Spradling 2005).

C'est le rôle de la voie de signalisation BMP/Smad qui est le plus connu dans le maintien des CSG. Deux ligands de cette voie, dpp et gbb, sont sécrétés par les cellules de la coiffe (*cap cells*) et répriment le gène *Bag-of-Marble (Bam)* dans les cellules souches, les empêchant ainsi de s'engager vers la différenciation (Chen & McKearin 2003). Une expression ectopique de dpp peut conduire des cystoblastes à se dé-différencier pour donner des CSG fonctionnelles (Kai & Spradling 2004). D'autre part, la protéine Piwi provenant des cellules de la coiffe collabore avec la voie BMP dans la répression de *Bam*, mais le mécanisme de l'action de Piwi par ce biais n'est pas élucidé (Szakmary et al. 2005).

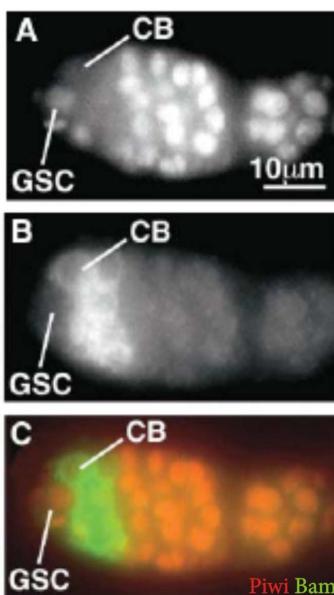


**Figure 19.** Division asymétrique de la cellule souche germinale (CSG) de l'ovaire de drosophile. La cellule souche est maintenue dans la niche par des jonctions adhérentes. Les facteurs dpp et gbb sont sécrétés par les cellules de la coiffe pour empêcher la différenciation de la CSG, par inhibition du gène *Bam*. La voie JAK/STAT serait également impliquée, par l'intermédiaire des *escort cells*. Piwi est exprimé par les cellules de la coiffe et par la CSG. Le couple Pum/Nos réprime la traduction des gènes de différenciation, mais leur action est contrecarrée par *Bam* dans le cystoblaste. Le centrosome assure l'orientation correcte du fuseau mitotique. *Figure originale.*

Moins connus sont les mécanismes intrinsèques qui jouent également un rôle dans l'auto-renouvellement des cellules souches. La mitose de la CSG est orientée de telle sorte que le cystoblaste s'éloigne des cellules de la niche, permettant au gène *Bam* d'échapper à la répression exercée par les cellules de la coiffe. L'orientation du fuseau mitotique est donc fondamentale dans l'établissement de cette asymétrie. C'est sur une structure appelée le spectrosome, toujours positionné au pôle apical de la CSG, que s'ancre et s'oriente le fuseau mitotique (Deng & Lin 1997). La nature exacte du spectrosome est mal connue, et il semblerait qu'il soit associé à des protéines membranaires (revue dans Yamashita et al. 2010). Par ailleurs, une étude récente (Karpowicz et al. 2009) montre que l'ADN

est ségrégué de façon asymétrique lors de la division de la CSG : l'ADN nouvellement synthétisé lors de la réPLICATION est hérité par le cystoblaste, alors que les brins-mères se retrouvent dans la cellule souche. Ce mécanisme, censé protéger la cellule souche des erreurs de réPLICATION de l'ADN, est connu sous le nom d'ISH (pour *Immortal Strand Hypothesis*) (Cairns 2002).

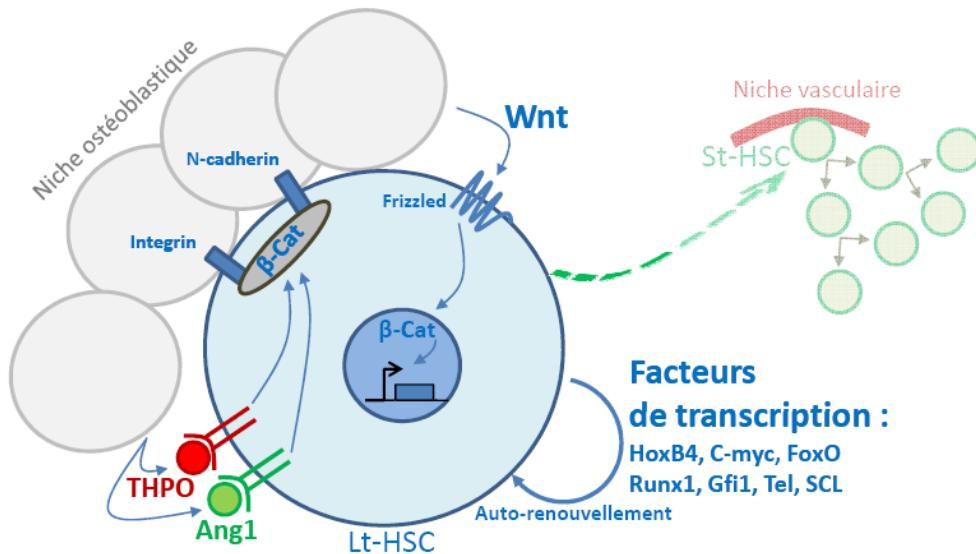
Par ailleurs, les gènes *Pumilio* et *Nanos* (*Nos*) contrôlent de façon intrinsèque le maintien des CSG en inhibant la traduction d'ARN codant pour des gènes de différenciation (Szakmary et al. 2005). Dans les cystoblastes, Bam contrecarre l'action du couple Pumilio/Nanos et permet l'engagement de la cellule dans l'ovogenèse (Kim et al. 2010). Dans la cellule souche, le gène *Bam* est inactivé par Piwi (voir Fig. 20 montrant la localisation complémentaire de Bam et Piwi dans l'ovariole).



**Figure 20.** Localisations complémentaires des protéines Piwi, et Bam. Les cellules souches (GSC) sont sur la gauche des images et l'ovogenèse progresse vers la droite. (A) La protéine Piwi est abondante dans les cellules souches, en faible quantité dans les cystoblastes (CB), et abondante dans les stades plus tardifs de l'ovogenèse. (B) Bam est présente dans les cystoblastes et n'est pas exprimé aux stades ultérieurs de l'ovogenèse. (C) Image composite montrant la distribution complémentaire des deux protéines. D'après Szakmary et al. (2005).

Les gènes *Pumilio*, *Nanos* et *Piwi* sont également connus pour leur rôle dans toute la lignée germinale de la drosophile. Avec d'autres gènes, tels *Vasa*, *PL10* et *Bruno*, ils entrent dans la composition du plasme germinal, un échafaudage périnucléaire de protéines et d'ARN hérités maternellement et qui assurent la détermination de la lignée germinale au cours de l'embryogénèse – en partie par la répression de gènes de différenciation somatique - ainsi que la protection du génome par la répression des rétrotransposons. Je reviendrai plus en détail sur ces gènes dans la partie 2.2, ainsi que dans l'article 1 (partie 2.3) car j'ai étudié leur expression dans les cellules souches de *Pleurobrachia pileus*.

## 2.1.3. La cellule souche hématopoïétique des mammifères : une cellule souche multipotente qui se maintient sur le long terme



**Figure 21.** Régulation des cellules souches hématopoïétiques à long terme (Lt-CSH). Le maintien de l'état quiescent est assuré par un ensemble de facteurs de transcription (HoxB4, C-Myc, FoxO, Runx1, Gfi1, Tel, SCL), ainsi que par des facteurs sécrétés par les ostéoblastes (Wnt, THPO et Ang1). Des intégrines et des cadhérines assurent le maintien de la Lt-CSH dans la niche ostéoblastique. Les cellules rejoignent la niche vasculaire pour entrer en prolifération, on les désigne alors comme des cellules souches à court terme (St-CSH). *Figure originale.*

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont localisées dans la moelle osseuse des adultes. Elles sont multipotentes, capables de donner tous les types cellulaires du système sanguin. Elles peuvent migrer d'une niche composée d'ostéoblastes vers une niche vasculaire, et passent alors d'un état de quiescence à un état de prolifération (Fig. 21). Dans la niche ostéoblastique, elles ne se divisent que très rarement (une fois tous les 1 à 5 mois) (Lange & Calegari 2010) et on parle alors de cellule souches à long terme (Lt-CSH) car cette division est asymétrique (Beckmann et al. 2007) et leur permet de perdurer durant toute la vie de l'individu (Reya 2003). Dans la niche vasculaire, les CSH se divisent rapidement et de façon symétrique, ce qui leur permet d'augmenter considérablement leur nombre, et on parle alors de cellules souches à court terme (St-CSH, revue dans Morrison & Kimble 2006).

La régulation entre l'état de quiescence et l'état prolifératif est donc de première importance dans la biologie des cellules souches hématopoïétiques. Du coup, la littérature foisonne d'études sur les gènes qui régulent la balance entre ces deux états, mais pas sur les mécanismes de l'asymétrie de division de la Lt-CSH elle-même.

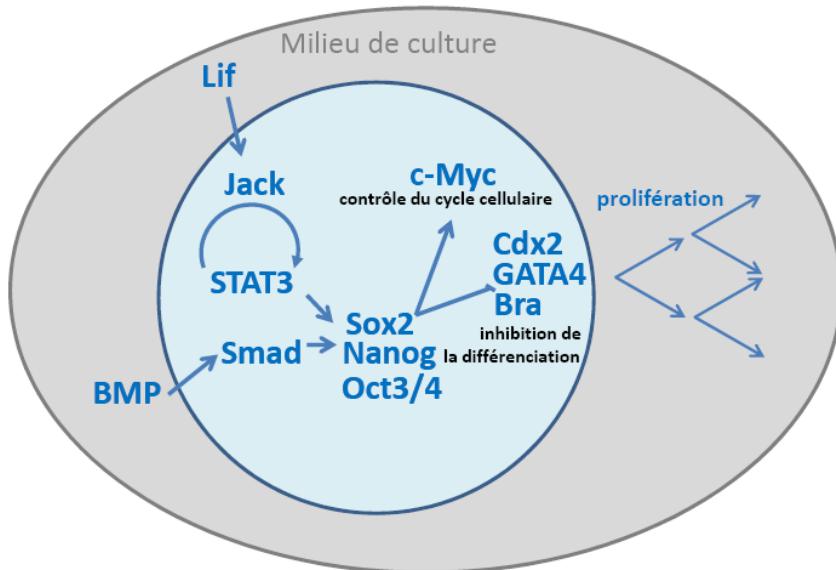
Plusieurs études de transcriptomique comparée ont tenté d'établir le profil d'expression des CSH (Ivanova et al. 2002 ; Rhamalo-Santos et al. 2002 ; Akashi et al. 2003 ; Venezia et al. 2004 ; Kiel et al. 2005 ; Chamber et al. 2007 ; Forsberg et al. 2010 ) en comparant par exemple le transcriptome des Lt-CSH avec celui des St-CSH. Les auteurs identifient dans chaque étude une batterie de gènes associés aux Lt-CSH. Mais ces études nous apprennent finalement peu de choses sur la biologie des cellules souches, la principale raison étant le très faible recouvrement entre ces différents travaux : aucun gène commun n'a été retrouvé par l'ensemble des sept études citées plus haut (Forsberg et al 2010).

En revanche les études fonctionnelles ciblées sur certains gènes ont révélé par exemple que HoxB4 et c-Myc empêchent la différenciation des CSH, que Zfx et FoxO inhibent l'apoptose, Bm1 la sénescence (revue dans Cellot & Sauvageau 2007), et que Gfi1 (protéine à doigt de zinc) et Tel/Etv6 sont nécessaires au maintien de l'état quiescent, leur inactivation empêchant l'hématopoïèse à long-terme (Zeng et al. 2004, Hock et al. 2004). Plus récemment, le rôle d'autres facteurs de transcription a été révélé. En étudiant la capacité des CSH à reconstituer le système sanguin d'une souris déficiente, Lacombe et al. (2010) ont montré que le facteur de transcription SCL/TAL1 (de la famille des bHLH) maintient la quiescence des CSH en empêchant leur entrée dans le cycle cellulaire. De plus, la mutation du gène Pbx 1 entraîne de nombreuses perturbations du réseau transcriptionnel des CSH (Ficara et al. 2008). Enfin, les souris KO pour Runx1 développent des leucémies dues à la dérégulation du cycle cellulaire des CSH. Par ailleurs, le stock de cellules souches finit par s'épuiser car l'inactivation de Runx1 empêche les Lt-CSH de se maintenir dans la niche ostéoblastique (revue dans Wang et al. 2010).

Le rôle de la niche comme source de facteurs extrinsèques est également fondamental. L'ancre des CSH à la niche ostéoblastique par les intégrines et les cadhérines est nécessaire au maintien de leur état de quiescence. Les ligands Ang-1 et THPO sécrétés par les ostéoblastes permettent le maintien des protéines d'adhésion à la niche (revue dans Arai & Suda 2008). Les voies Notch et Sonic hedgehog semblent impliquées dans le taux de prolifération des CSH, et le rôle de la voie Wnt/β-catenin est bien documenté (Suda et Arai 2008) : l'inhibition de la voie Wnt par Dickkopf augmente le nombre de CSH proliférantes (St-CSH) et réduit leur capacité à repeupler durablement le système sanguin d'une souris déficiente (Fleming et al. 2008)

En somme, bien que les CSH soient considérées comme un exemple type de cellule souche, on sait peu de choses sur la façon dont elles font de la division asymétrique. L'intérêt qu'elles ont suscité notamment en recherche biomédicale provient surtout de leur multipotence, de leur capacité de prolifération et de la constatation évidente qu'elles peuvent se maintenir sur le très long terme.

## 2.1.4. La cellule souche embryonnaire des mammifères est-elle vraiment une cellule souche ?



**Figure 22.** Réseau transcriptionnel d'une cellule souche embryonnaire de souris en culture. Les facteurs Lif et BMP sont nécessaires à la prolifération de la cellule. Les facteurs de transcription Sox2, Nanog et Oct3/4 sont au cœur du réseau transcriptionnel. Ils sont activés par les voies Lif/JACK-STAT et BMP/Smad. Ils inhibent les gènes de différenciation *Cdx2*, *GATA4* et *Bra* et activent le gène *c-Myc*. *Figure originale*.

Les cellules souches embryonnaires de mammifères (appelées également cellules ES) sont très étudiées pour leur capacité à donner des tissus appartenant aux trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme). Ces cellules constituent l'amas embryogène du stade blastocyste 5 à 7 jours après la fécondation, et sont pluripotentes, mais pas totipotentes car elles ne peuvent donner les annexes extra-embryonnaires (seuls les premiers blastomères, et le zygote, sont totipotents) (voir Glossaire). Les cellules souches embryonnaires ne se maintiennent que pendant un court laps de temps, 24 heures chez la souris (Smith 2010). En revanche, elles peuvent être maintenues dans un état pluripotent et proliférer indéfiniment lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions adéquates (par exemple, dans le cas des cellules ES de souris, ajout de facteurs Lif et BMP dans le milieu de culture). Il n'y a, à ma connaissance, aucun élément permettant de penser qu'une cellule souche embryonnaire se divise de façon asymétrique *in vivo*. *In vitro*, ces cellules souches prolifèrent symétriquement, et peuvent expérimentalement être amenées à se différencier si les conditions sont modifiées. Grâce aux études menées sur des cellules ES en culture, on a maintenant une bonne connaissance du réseau transcriptionnel et des voies de signalisation qui maintiennent ces cellules dans l'état pluripotent (Fig. 22). La prolifération des cellules ES est qualifiée par les auteurs du domaine de

*self-renewal*, mais cela n'a rien à voir avec l'auto-renouvellement dû à une division asymétrique comme dans le cas d'un neuroblaste par exemple. Il s'agit en fait de prolifération permettant de conserver la culture cellulaire pendant un temps assez long.

Au cœur du réseau transcriptionnel des cellules ES se situent les facteurs de transcription Sox2, Nanog et Oct3/4 (Nichols et al. 1998 ; Chambers et al. 2003 ; Avilion et al. 2003 ; revue dans Katsumoto et al. 2010), qui inhibent l'expression de gènes de différenciation. Par exemple Oct3/4 bloque l'expression de *Cdx2*, qui promeut la différenciation du trophectoderme (Niwa et al. 2005), Nanog empêche la formation de l'endoderme en agissant sur *GATA4*, et du mésoderme en agissant sur *Brachyury* (Mitsui et al. 2003 ; Suzuki et al. 2006). Chez la souris, Takahashi & Yamanaka en 2006, ont réussi à convertir des fibroblastes matures en cellules pluripotentes, et ce en transfectant ces fibroblastes par transduction rétrovirale avec quatre gènes : *Oct 4*, *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc* (régulateur du cycle cellulaire). Les facteurs de transcription sont eux-même sous le contrôle de voies de signalisation dont les ligands sont fournis par le milieu de culture. Les cellules ES de souris par exemple sont maintenues en culture grâce à la collaboration des voies Lif/STAT3 et Bmp/Smad (Ying et al. 2003 ; Ying et al. 2008). Niwa et al. (2009) ont montré que la fixation de Lif sur son récepteur active plusieurs voies de signalisation parallèles qui maintiennent la pluripotence des cellules ES. Par contre, le maintien en culture des cellules souches embryonnaires humaines dépend largement du facteur FGF2.

Les cellules souches embryonnaires diffèrent des exemples que nous avons vus précédemment car elles ne s'auto-renouvellent pas *in vivo* : elles disparaissent en quelques heures lors du développement. Leur dénomination de cellule souche vient vraisemblablement du fait qu'elles sont les cellules mères de toutes les cellules de l'embryon<sup>9</sup>. Mais, dans ce cas, pourquoi ne pas appeler cellules souches tous les autres blastomères, à n'importe quel stade du développement ? Si c'est la pluripotence qui définit une cellule souche, alors il faut par exemple exclure la cellule germinale de drosophile du concept de cellule souche. Mais si c'est l'auto-renouvellement qui définit une cellule souche, alors les cellules souches embryonnaires ne sont pas des cellules souches. De mon point de vue, les cellules souches embryonnaires cadrent davantage avec la définition de progéniteurs indifférenciés ayant la capacité de proliférer, qu'avec celle de cellules souches.

---

<sup>9</sup> Cela vient aussi du fait qu'elles peuvent se cultiver indéfiniment et sont capables de se différencier selon plusieurs voies en fonction des facteurs environnementaux ajoutés au milieu de culture. On les appelle cellules souches dans le cadre thérapeutique car sur le plan médical, elles offrent la perspective d'une source de cellules pour la réparation des tissus lésés chez l'adulte.

## 2.1.5. Quelques caractéristiques partagées par les cellules souches, mais qui ne leur sont pas propres

Nous venons de voir quelques exemples des cellules souches, dont nous discuterons par la suite l'hétérogénéité du mode de fonctionnement. Mais avant cela je voudrais m'attarder sur quelques aspects de la biologie des cellules souches : la régulation de la phase G1 du cycle cellulaire, l'état indifférencié et la protection de l'intégrité du génome par l'activité télomérase. Ces caractéristiques réputées être des marqueurs de cellules souches sont largement utilisés dans des contextes précis comme critères pour identifier ou caractériser les cellules souches. Mais on va voir qu'elles ne sont pas propres aux cellules souches et ne peuvent en constituer un élément de définition.

### A - La régulation de la phase G1 du cycle cellulaire

Comme nous l'avons vu à travers plusieurs exemples, la régulation du cycle cellulaire est fondamentale dans la biologie des cellules souches, qui peuvent entrer en quiescence, mais qui peuvent également se diviser activement ou au contraire s'engager en différenciation. C'est la longueur de la phase de croissance G1 qui est modulable : les cellules qui prolifèrent ont une très courte phase G1 alors que les cellules qui s'engagent en différenciation ont une phase G1 longue, pendant laquelle se mettent en place les événements qui accompagnent cette différenciation. Dans les cellules quiescentes, la transcription et la traduction sont réprimées, la phase G1 est très longue et l'on parle alors de phase G0.

Le couple Cycline / Cdk (pour *Cyclin dependent kinase*) agit sur la longueur de la phase G1 des cellules souches embryonnaires, nerveuses et hématopoïétiques des mammifères (revue dans Lange et Calegari 2010). Des résultats chez la drosophile vont dans le même sens : l'inhibition du couple Cyclin E/Cdk2 par la protéine Dacapo (Dap) induit la différenciation des photorécepteurs lors du développement de l'œil (Sukhanova & Du 2008). Mais bien-sûr, la régulation du cycle cellulaire par Cyclin/Cdk n'est pas l'apanage des cellules souches. Par exemple, une étude montre que chez les drosophiles mutantes pour le gène *Dap*, l'ovogénèse est perturbée : la méiose étant retardée et une mitose surnuméraire ayant lieu (Narbonne-Reveau & Lilly 2009). D'autre part les cellules différencierées, qui ne se divisent pas, sont également en phase G0.

## B - La question du lien entre l'état indifférencié et les cellules souches

Dans les quatre exemples traités ci-dessus, les cellules souches ont toutes une morphologie que l'on peut qualifier d'indifférenciée. Dans la majorité des cas les cellules souches ont une forme plus ou moins sphérique, sans polarisation structurale marquée ; elles ont un fort rapport nucléo-cytoplasmique avec un nucléole proéminent, et leur cytoplasme contient peu d'organites ; enfin, elle n'arborent aucune structure particulière (cil, villosité, vésicules...). Mais cette morphologie cellulaire ne concerne pas uniquement les cellules souches, mais aussi les progéniteurs qui sont engagés dans une voie de différenciation mais qui sont encore morphologiquement proches des cellules souches. D'autre part, le nucléole est présent dans toutes les cellules (même si sa taille varie) car il est le site de maturation des ARN ribosomiques. Un fort rapport nucléo-cytoplasmique s'observe dans bon nombre de cellules différenciées (par exemple dans la plupart des spermatozoïdes, ou encore dans certains colloblastes des cténaires, Carré & Carré 1993). Cela étant dit, dans un lignage cellulaire donné, le caractère indifférencié est un critère qui permet d'identifier des cellules souches d'un point de vue opérationnel, mais uniquement s'il est associé à d'autres arguments (dynamique cellulaire, localisation dans une niche....)

Il faut ajouter qu'il existe également des exemples de cellules parfaitement différenciées qui sont capables de proliférer pour maintenir ou régénérer un tissu. Chez les mammifères, c'est le cas bien connu des hépatocytes : une ablation de trois des cinq lobes du foie de la souris est suivie d'une prolifération des hépatocytes qui restituent les parties amputées. Les hépatocytes peuvent également se trans-différencier pour donner des cellules épithéliales biliaires (revue dans Michalopoulos 2009). Dans le paragraphe 2.2.3, nous allons aussi voir que chez les hydres (des polypes de cnidaires) les cellules myo-épithéliales prolifèrent et assurent le renouvellement de l'épithélium : elles sont qualifiées de cellules souches épithéliales (Bosch 2010). Chez certains urochordés coloniaux, les cellules ectodermiques participent au bourgeonnement des zoïdes produits par reproduction asexuée (Kawamura & Sunanaga 2010). Néanmoins dans ce cas précis, ces cellules passent par une phase de dé-différenciation. Enfin, les choanocytes d'éponges représentent un autre exemple de cellules différenciées capables de se diviser et par là de renouveler le tissu qu'elles constituent (Funayama 2010).

La question est de savoir si l'on considère ces cellules comme des cellules souches ou non. D'un côté, elles remplissent le même rôle que dans les exemples traités précédemment : elles donnent des cellules différenciées pour l'homéostasie ou la croissance de l'organisme, et elles se renouvellent tout en maintenant leur propre identité. Mais, d'un autre côté, elles ne constituent pas un stock de cellules à part (« *set-aside* ») spécialement dévolu à cette fonction. Finalement, selon le point de vue que l'on adopte, on peut considérer ces hépatocytes, choanocytes, etc... comme des cellules souches, ou non.

## C - L'activité télomérase protège l'intégrité du génome

A chaque mitose, la réPLICATION de l'ADN s'accompagne d'erreurs, mais également du raccourcissement de l'extrémité des chromosomes, les télomères, à cause de problèmes de fin de réPLICATION. Les télomères doivent donc être sans cesse renouvelés pour maintenir l'intégrité de la chromatine. Ceci est particulièrement vrai dans deux situations : dans la lignée germinale, car celle-ci transmet le patrimoine génétique de génération en génération, et dans les cellules souches, dont le génome doit rester intact de réPLICATION en réPLICATION, tout au long de la vie de l'individu. L'allongement des télomères est assuré par une transcriptase réVERSE appelée télomérase. Chez les humains, l'activité télomérase a été détECTÉE dans la lignée germinale, dans les cellules souches et dans plusieurs progéniteurs indifférenciés (revues dans Flores et Blasco 2010 ; Gomes et al. 2010). Flores et al. (2008) ont étabLI la hiérarchie de la longueur des télomères dans le follicule pileux de la souris : les cellules souches ont les télomères les plus longs, et ils décroissent au fur et à mesure de la différenciation des cellules du poil. D'autre part, la diminution de l'activité télomérase est responsable du vieillissement. Des souris mutantes pour certaines sous-unités de la télomérase souffrent de vieillissement prématUré dû au dysfonctionnement de leurs cellules souches, mais également à la sénescence de cellules somatiques différenciées (Sahin & Depinho 2010).

L'activité télomérase est donc un aspect très important de la biologie des cellules souches, et vraisemblablement de leur évolution. Le motif constituant les télomères des vertébrés (TTAGGG)<sub>n</sub>, ainsi que l'enzyme télomérase sont d'ailleurs conservés à travers l'ensemble des métazoaires (Gomes et al. 2010 ; Hemmrich & Bosch 2008)<sup>10</sup>. Une activité télomérase a été monTRÉE dans les agrégats de cellules souches d'éponges, les primmorphes (Müller & Müller 2003). Mais comme dans les cas de la régulation du cycle cellulaire et de l'état indifférencié, traités plus haut, l'activité télomérase concerne également des progéniteurs indifférenciés, la lignée germinale et même des cellules somatiques différenciées. Par exemple, chez les jeunes souris, les télomères ne sont pas plus courts dans les cellules différenciées que dans les cellules souches (Flores et al. 2008).

---

<sup>10</sup> Sauf chez la drosophile, qui ne possède ni ce motif (TTAGGG)<sub>n</sub>, ni activité télomérase, et chez laquelle l'allongement des télomères se fait grâce à des rétrotransposons (Capkova Frydrychova et al. 2008).

## 2.1.6. Conclusion : Peut-on considérer la cellule souche comme un type cellulaire ?

	Potentiel	Durée	Division	Type d'asymétrie	Exemples de marqueurs moléculaires
Neuroblaste larvaire de drosophile	<b>multipotente</b>	<b>moyen terme</b> (vie larvaire)	<b>Asymétrique</b>	Principalement <b>intrinsèque</b>	<b>Snail, Asense, Deadpan</b>
Cellule souche germinale adulte de drosophile femelle	<b>unipotente</b>	<b>long terme</b> (vie adulte)	<b>Asymétrique</b> en conditions normales <b>Symétrique</b> en conditions expérimentales	Principalement <b>extrinsèque</b> Facteurs intrinsèques également	<b>Nanos, Pumilio, Piwi</b>
Cellule souche embryonnaire de mammifères	<b>pluripotente</b>	<b>court terme</b> (long terme en culture)	<b>Symétrique</b>	?	<b>Sox2, Nanog, Oct3/4</b>
Cellule souche hématopoïétique adulte de mammifère	<b>multipotente</b>	<b>long-terme</b> (vie adulte)	<b>Symétrique ou Asymétrique</b>	Régulation du cycle cellulaire	<b>Runx1, Tel, SCL</b>

Tableau 1. Tableau résumant les données exposées dans la partie 2.1.

Un type cellulaire est un ensemble de cellules, identifié comme homogène d'un point de vue morphologique, biochimique, moléculaire et surtout fonctionnel (Masland 2004, Arendt 2005, Nelson et al. 2006). Le concept de type cellulaire s'accompagne de l'idée d'homologie. Des cellules appartenant à un même type cellulaire chez différentes espèces sont héritées d'un type cellulaire ancestral chez l'ancêtre commun à ces espèces ; des cellules d'un même type ancestral peuvent également s'être spécialisées en plusieurs types cellulaires dans un même organisme : on parle alors de types cellulaires frères (*sister cell type* ; Arendt 2008). L'homologie entre des types cellulaires est établie traditionnellement sur le partage de caractères ultrastructuraux, et plus récemment sur la conservation de leur signature transcriptomique (Arendt 2005). Est-il alors possible d'appliquer ce concept aux cellules souches ? En conséquence, pouvons-nous tester l'homologie des cellules souches rencontrées chez les métazoaires ?

La question de l'évolution des types cellulaires a été largement développée ces dernières années par Detlev Arendt, qui considère qu'il s'agit d'une entité fondamentale de l'organisation des métazoaires et met largement l'accent sur l'importance de la fonction pour définir un type cellulaire. L'idée principale de sa réflexion est que la diversification des types cellulaires s'est effectuée au cours de l'évolution par l'acquisition de nouvelles fonctions ou par la ségrégation des fonctions à partir de

types cellulaires ancestraux multifonctionnels. Dans son article de 2008 dans *Nature Reviews*, il écrit : « *Animals are composed of cell types that are specialized for functions as diverse as nutrient uptake, contraction, light perception and hormone secretion* » (Arendt 2008).

Quelle est la fonction que remplit une cellule souche ? Il est clair que toutes les populations de cellules souches ont pour fonction de fournir des cellules différenciées, pour alimenter ou régénérer tout ou partie d'un organisme, et cela sur le long, le court, ou le moyen terme. Mais le fait qu'une cellule fille s'engage dans une voie de différenciation ne constitue pas une fonction de la cellule souche elle-même. C'est particulièrement vrai lorsque la division de la cellule souche est intrinsèquement symétrique, et que l'asymétrie est assurée par des facteurs extérieurs (comme nous l'avons vu dans l'exemple de la cellule souche germinale de drosophile). Finalement, la fonction d'une cellule souche est à la fois très concrète (fournir des cellules différenciées), et très peu palpable, puisque cette cellule doit surtout rester identique à elle-même de mitose en mitose. La multipotence, qui ne concerne que certaines cellules souches, n'est pas non plus à proprement parler une « fonction » des cellules souches.

La notion de type cellulaire véhicule par ailleurs l'idée que des cellules d'un même type dans différentes espèces sont issues d'un type cellulaire ancestral chez l'ancêtre commun de ces espèces. Mais pour établir un tel lien phylogénétique, encore faut-il identifier des caractères homologues soutenant l'apparentement entre les cellules d'un même type. Arendt poursuit : « *It was often difficult to decide whether shared cellular features, such as the surface-enlarged photoreceptive cilium of a photoreceptor cell or the stripes of a striated muscle cell, reflected common ancestry or independent evolution* ». Dans le cas des cellules souches, le problème se pose en des termes différents : il n'y pas de caractère cellulaire qui unisse toutes les cellules communément appelées cellules souches, et qui leur soit propre. La taille importante du noyau et du nucléole concerne quelques cellules souches non différenciées mais également leur descendance directe, les progéniteurs. D'autre part, l'absence d'organites cytoplasmiques ou de structures spécialisées (cils, microvillosités, vésicules) ne donne aucune prise pour interroger l'homologie des cellules souches. Bien que la morphologie indifférenciée constitue un critère valable pour identifier les cellules souches d'un lignage cellulaire donné, elle ne peut servir de base pour établir que les cellules souches constituent un type de cellule à part entière.

Arendt voit dans les études moléculaires l'opportunité d'accéder à de nouveaux caractères permettant de tester l'homologie des types cellulaires, et notamment entre des taxons très éloignés, car dans ce cas la morphologie des cellules peut avoir tellement dérivé qu'elle n'est daucun secours : « *For the first time, comparing molecular fingerprints allows us to identify homologous cell types over long evolutionary distances and thereby reconstruct systems such as the urbilaterian brain, eyes and immune system* ». Les gènes qui constituent la signature moléculaire d'un type cellulaire sont d'une

part les facteurs de transcription et les gènes régulateurs du contrôle de la différenciation cellulaire, et d'autre part les gènes codant pour des protéines grâce auxquelles les cellules assurent leur fonction. En ce qui concerne les cellules souches des organismes modèles classiques, on a vu qu'aucun facteur de transcription ne semble les unifier. Les facteurs de transcription qui maintiennent l'état souche de ces cellules ne sont pas partagés (voir Tableau 1). Certains ne sont pas conservés à large échelle taxonomique, comme *Oct4* et *Nanog*, facteurs de transcription clefs du maintien de la pluripotence des cellules ES (voir § 2.1.4.), qui n'ont pas d'orthologues en dehors des vertébrés. D'autre part, les mécanismes moléculaires extrinsèques, principalement les voies de signalisation, qui assurent l'asymétrie de la division des cellules souches sont utilisés dans de nombreux autres contextes de la biologie des métazoaires (par exemple le rôle conservé de la voie Wnt dans l'établissement de l'axe principal du corps ; de la voie BMP dans la régionalisation dorso-ventrale des Bilateria ; Niehrs 2010). Ils ne sauraient donc constituer en eux-mêmes une signature moléculaire des cellules souches. Les mécanismes qui sous-tendent l'asymétrie au sein de la progéniture des cellules souches sont également très hétéroclites (Tableau 1). Enfin, les quelques aspects moléculaires de la régulation du cycle cellulaire ou de la protection des télomères sont trop largement utilisés chez les métazoaires pour constituer une signature des cellules souches. En l'absence de caractères moléculaires papables, il est impossible de se prononcer sur l'homologie des cellules souches.

Bien sûr il ne s'agit pas ici de critiquer la démarche proposée par Arendt car elle est très pertinente pour comprendre l'évolution de types cellulaires tels que les cellules photoréceptrices ou les types cellulaires neuronaux du cerveau des Bilateria (Arendt 2003, Arendt et al. 2004, Tessmar-Raible et al. 2007, Arendt 2008). Mais cette démarche paraît difficilement applicable aux cellules souches. On peut d'ailleurs noter qu'Arendt ne fait aucune mention des cellules souches dans ses articles traitant des types cellulaires.

L'inadéquation entre le concept de type cellulaire et celui de cellule souche peut également être révélatrice de l'absence d'homologie entre ces cellules. Il est à mon avis envisageable que les différentes catégories de cellules souches dans différentes lignées animales (et au sein d'une même espèce) ne soient pas héritées d'un type cellulaire souche ancestral. Il est possible que le maintien et la régénération des tissus soient d'une telle importance dans la biologie d'un organisme, que des mécanismes de cellules souches se soient mis en place indépendamment dans plusieurs contextes, mettant en jeu divers mécanismes. C'est du moins ce que semble suggérer l'hétérogénéité des mécanismes moléculaires impliqués dans le fonctionnement des cellules souches chez les grands modèles classiques (Tableau 1).

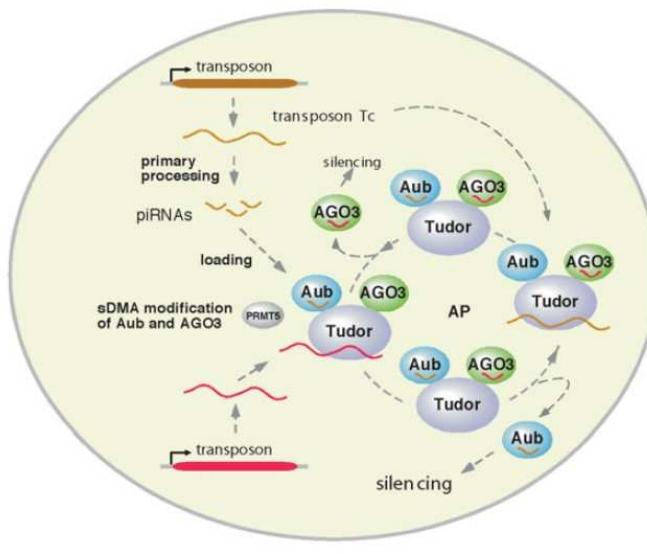
La partie 2.2 qui suit va nous permettre d'élargir cette discussion en prenant en considération des résultats récents concernant des modèles peu traditionnels de biologie du développement. Ces modèles

possèdent tous des cellules souches multi- ou totipotentes qui expriment une série de gènes qui avaient été initialement considérés comme spécifiques de la lignée germinale. Ces gènes pourraient s'avérer constituer une « signature moléculaire » ancestrale des cellules souches des métazoaires, ce qui eut égard aux considérations précédentes représente un certain retournement de situation !

## 2.2. Expression des « marqueurs de la lignée germinale » dans des cellules souches multi- et totipotentes chez de nouveaux organismes modèles

Les gènes sur lesquels je vais centrer mon exposé à partir de maintenant sont connus depuis longtemps comme des marqueurs de la lignée germinale. Chez la drosophile, les vertébrés (p. ex. le poisson zèbre et le xénophage) et le nématode par exemple, ils constituent le plasme germinal, un ensemble de protéines et d'ARN qui jouent un rôle dans la spécification, la différenciation et le maintien de la lignée germinale (pour des revues sur ce thème, à l'échelle de l'ensemble des métazoaires, voir Extavour & Akam 2003 ; Extavour 2007 ; Leclerc 2008). La première protéine du plasme germinal a avoir été identifiée l'a été chez la drosophile ; il s'agit de Vasa, une hélicase du groupe des DEAD-box, qui promeut la traduction d'autres gènes de la lignée germinale (Gustafson & Wessel 2010).

Parmi les composants du plasme germinal, on trouve aussi ceux qui inhibent la transcription, par interférence avec les ARN maternel, localisé dans l'oeuf,, et permettent la protection du génome en inactivant les rétrotransposons, comme la protéine Piwi (Cox et al. 1998, Thomson & Lin 2009, Siomi et al. 2010) (Fig. 23). Chez la drosophile, Piwi et Vasa interagissent directement et sont impliquées dans la même machinerie d'inactivation des rétrotransposons (Vagin et al. 2004). On trouve dans le plasme germinal de nombreux autres constituants (*Pumilio*, *Staufen*, *Mago*, *Germ cell less...*), parmi lesquels PL10, une hélicase indispensable pour le bon déroulement de la spermatogénèse (Abdelhaleem 2005), ainsi que la protéine de fixation à l'ARN Bruno (protéine à domaine RRM) qui interagit directement avec Vasa (Webster et al. 1997). Des orthologues de *Piwi*, *Vasa*, *Bruno* et *PL10* ont été identifiés, et leur expression caractérisée dans les cellules souches des modèles non classiques que je vais présenter maintenant. L'expression de ces gènes chez le cténaire *Pleurobrachia pileus* fait l'objet de l'article qui clôt ce chapitre sur les cellules souches (Article 1).



**Figure 23.** Mécanisme de répression des transposons par les protéines Piwi dans une cellule germinale de l'ovaire de drosophile. Aubergine (Aub) et AGO3 sont deux des trois paralogues de Piwi chez la drosophile (voir Article 1, Fig. S2). De petits ARNs appelés piRNAs sont produits par transcription antisens de séquences de transposons suivie de leur clivage (molécules représentées en orange). Ils sont chargés sur la protéine Aub. Un mécanisme appelé boucle d'amplification (**AP**, pour amplification loop) impliquant AGO3 permet d'augmenter la quantité des piRNA. Les transcrits (sens) des transposons (rouge) sont clivés par le complexe Aub-piRNA-Tudor. Il faut noter qu'outre la répression des transposons, la machinerie Piwi est également impliquée dans la répression de certains gènes (p. ex. *stellate* et *vasa* dans les testicules). *D'après Siomi et al. (2010).*

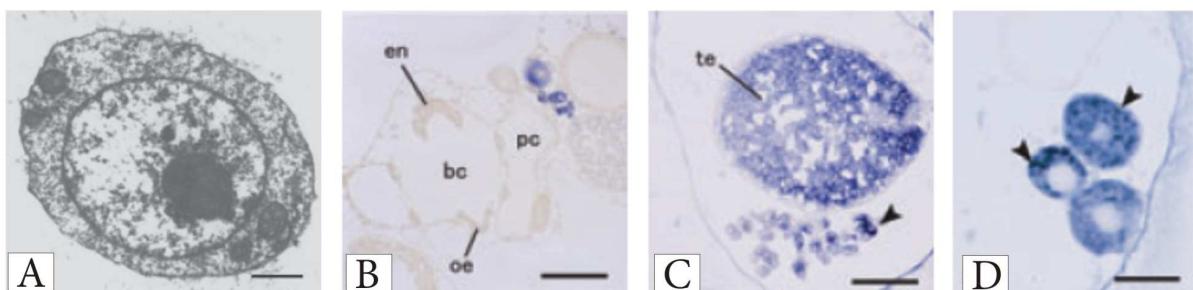
## 2.2.1. Les hémoblastes des ascidies coloniales

Les ascidies coloniales sont des urochordés, groupe-frère des vertébrés (Delsuc et al. 2006). Elles peuvent se reproduire par un phénomène de bourgeonnement asexué, la blastogénèse, dont le résultat est une colonie constituée d'un ensemble d'individus génétiquement identiques, appelés blastozoïdes. Les blastozoïdes sont contenus dans une tunique commune et parfois reliés par une vascularisation extra-corporelle dans laquelle circule le sang. La capacité à faire de la reproduction asexuée est liée à la très grande capacité de régénération des ascidies coloniales, un seul zoïde pouvant régénérer une colonie entière (Tiozzo et al. 2007). Les processus de bourgeonnement et de régénération sont assurés par plusieurs populations de cellules souches. Par exemple, dans la famille des Botryllidae, les cellules épithéliales sont capables de se dé-différencier. Mais circulent également dans le sang des hémoblastes, cellules multipotentes qui donnent la majorité des types cellulaires du futur blastozoïde, y compris la lignée germinale (Tiozzo et al. 2007).

Les hémoblastes sont identifiables d'après leurs caractères morphologiques, à savoir un fort rapport nucléo-cytoplasmique, un cytoplasme contenant peu d'organites et un nucléole proéminent (Fig. 24A). Dans le genre *Botryllus*, les hémoblastes circulants s'installent à l'endroit du futur bourgeon (phénomène de homing), prolifèrent de façon symétrique, puis se différencient en plusieurs types cellulaires pour constituer un bourgeon fonctionnel. L'auto-renouvellement des hémoblastes a été démontré en 1964 par les expériences de Freeman : en greffant des hémoblastes sur des ascidies

irradiées, il restaure leur capacité à bourgeonner (Freeman 1964). En 2005, Laird et al. reproduisent une expérience similaire, mais cette fois-ci ils diminuent suffisamment la concentration d'hémoblastes greffés, jusqu'à coloniser l'ascidie hôte par un hémoblaste unique. L'hôte greffé restaure alors une population complète d'hémoblastes, démontrant à nouveau la capacité d'auto-renouvellement de ces cellules (Laird et al. 2005). De plus, lorsqu'un hémoblaste unique est injecté, celui-ci donne soit uniquement des dérivés somatiques, soit uniquement des dérivés germinaux. Deux hypothèses sont alors envisagées par les auteurs : ou bien la population pluripotente d'hémoblastes contient en fait des hémoblastes somatiques et des hémoblastes germinaux, ou bien tous les hémoblastes sont multipotents, leur destinée dépendant de la niche dans laquelle ils vont se fixer (homing). La question n'est pas sans importance puisque dans le premier cas, cela signifie qu'il y a séparation soma/germen (comme chez la plupart des Bilateria), alors que dans le cas contraire, il n'y a pas séparation soma/germen (comme par exemple chez les cnidaires et les éponges).

Cette épineuse question a beaucoup intrigué différents auteurs, qui tentent d'y répondre en étudiant l'expression du gène *Vasa* comme marqueur de la lignée germinale. Chez *Botryllus primegenus*, Sunanaga et al. (2006) ont montré de façon convaincante que l'expression de *Vasa* est restreinte aux cellules germinales et à une sous-population d'hémoblastes à destinée strictement germinale (la « loose cell mass ») (Fig. 24B-D).

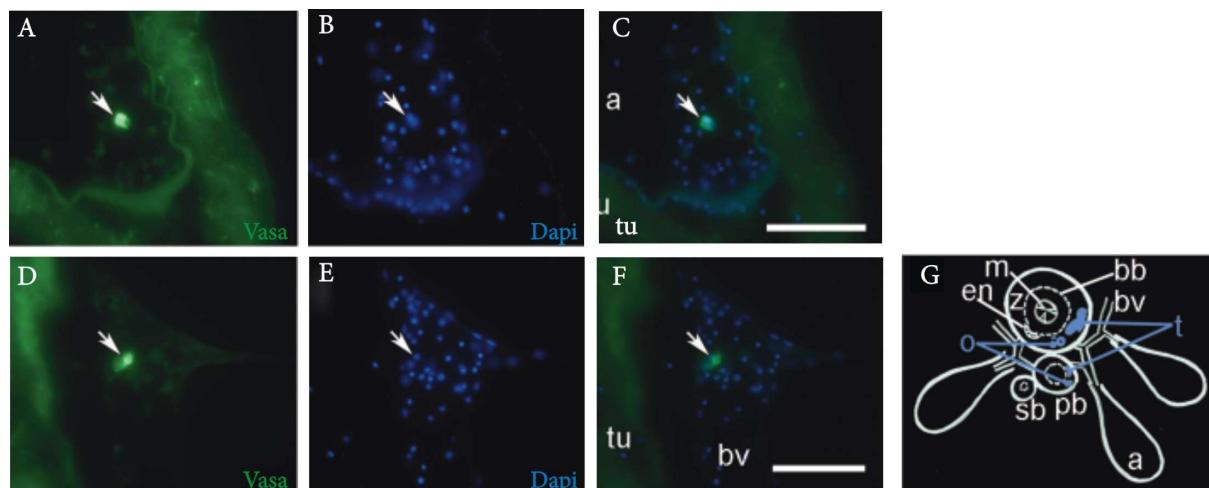


**Figure 24.** Expression de *Vasa* dans les hémoblastes de la lignée germinale chez *Botryllus primegenus*. (A) Un hémoblaste dans l'hémocoele, possédant un nucléole bien visible et un cytoplasme avec peu de mitochondries. (B-D) Hybridation *in situ* de *BpVasa*. (B) Dans un bourgeon en développement, *BpVasa* est exprimé uniquement dans les cellules germinales. Barre d'échelle = 100 µm. (C) « Loose cell mass » (tête de flèche) et testicule (te) exprimant *BpVasa*. Barre d'échelle = 20 µm. (D) Ovocytes en maturation exprimant *BpVasa*. bc : chambre branchiale, en : endostyle, oe : œsophage, pc : chambre péribranchiale, te : testicule. D'après Kawamura & Sunanaga (2010).

En revanche, chez *Botryllus schlosseri* et *Botrylloides violaceus*, *Vasa* est exprimé non seulement dans la lignée germinale, mais également dans des hémoblastes circulant dans le système vasculaire (Rosner et al. 2009 ; Brown and Swalla 2007) (Fig. 25). De façon surprenante, et quelque peu teintée d'essentialisme, les auteurs font la déduction, sans autre forme de démonstration, que ces hémoblastes

*Vasa*-positifs sont des précurseurs de la lignée germinale. Pour cela, ils s'appuient sur le fait que *Vasa* est également exprimé dans les gonades et dans la lignée germinale d'autres espèces (Sunanaga et al. 2006). Mais à mon sens cela ne présage en rien d'autres sites d'expression et fonctions potentiels de *Vasa* qui pourrait être exprimé dans des cellules souches multipotentes comme chez les planaires (cf. ci-après § 2.2.2.). C'est d'ailleurs sur cette hypothèse que Brown & Swalla (2007) concluent leur article, alors que Rosner et al (2009) sont beaucoup moins nuancés et restent sur l'idée d'un lien entre *Vasa* et la lignée germinale.

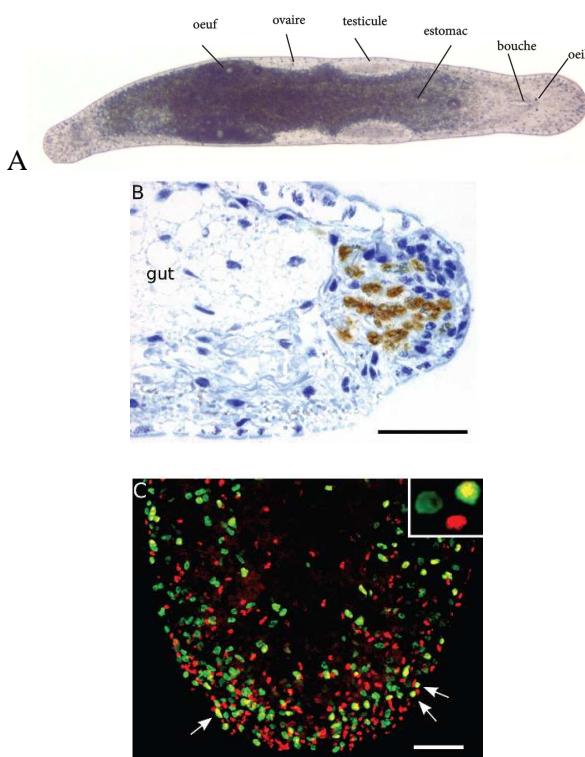
Enfin, Rosner et al. (2009) ont également établi l'expression de *Vasa*, *Piwi* et *PL10* dans plusieurs territoires somatiques de *Botryllus schlosseri*. Ces gènes sont notamment exprimés dans les cellules de « type macrophage » (« *macrophage-like cells* », Rosner et al. 2009) localisées près de l'endostyle (goulotte ciliée ventrale du pharynx), lequel a été identifié par Voskoboinic et al. (2008) comme une niche de cellules souches. Ils sont également exprimés dans les cellules de l'épithélium atrial, qui est connu pour fournir des cellules souches lors du bourgeonnement asexué des Botryllidae (Kawamura & Sunanaga 2010).



**Figure 25.** Expression de *Vasa* (hybridation *in situ* fluorescente) dans des cellules circulantes du sang de *Botryllus violaceus* (flèches). (A-C) Une cellule marquée dans une ampoule (a), extension extra-corporelle du système circulatoire. (D-F) Une cellule marquée dans un vaisseau sanguin. (G) Représentation schématique d'un zoïde. **a** : ampoule, **bb** : branchies, **bv** : vaisseau sanguin, **en** : endostyle, **m** : bouche, **pb** : bourgeon primaire, **sb** : bourgeon secondaire, **tu** : tunique, **z** : zoïde. D'après Brown & Swalla (2007).

## 2.2.2. Les néoblastes des planaires

Les planaires sont des protostomiens, lophotrochozoaires (comme les annélides et les mollusques) appartenant à l'embranchement des plathelminthes. Réputées d'organisation simple, les planaires possèdent pourtant un corps élaboré, triploblastique et bilatéral, comprenant un pharynx, une bouche, un cerveau, plusieurs types de neurones, ainsi qu'un appareil génital très complexe, au moins chez les rhabditophores. L'une des particularités les plus fascinantes des planaires est leur extrême capacité de régénération. Un petit morceau du corps d'une planaire est capable de régénérer un individu entier et complet (revue dans Shibata et al. 2010). Cette faculté de régénération est assurée par un seul et même type cellulaire totipotent : le néoblaste<sup>11</sup> (revue dans Shibata et al. 2010). Les néoblastes sont en effet les seules cellules des planaires à proliférer, comme en attestent les marqueurs de prolifération (PCNA, anti-phospho-histone H3, BrDy) (Newmark & Sanchez Alvarado 2000 ; Ladurner et al. 2000). Lors de la régénération de parties lésées, les néoblastes se concentrent au site de régénération et prolifèrent avant de se différencier (Fig. 26, Fig. 27).

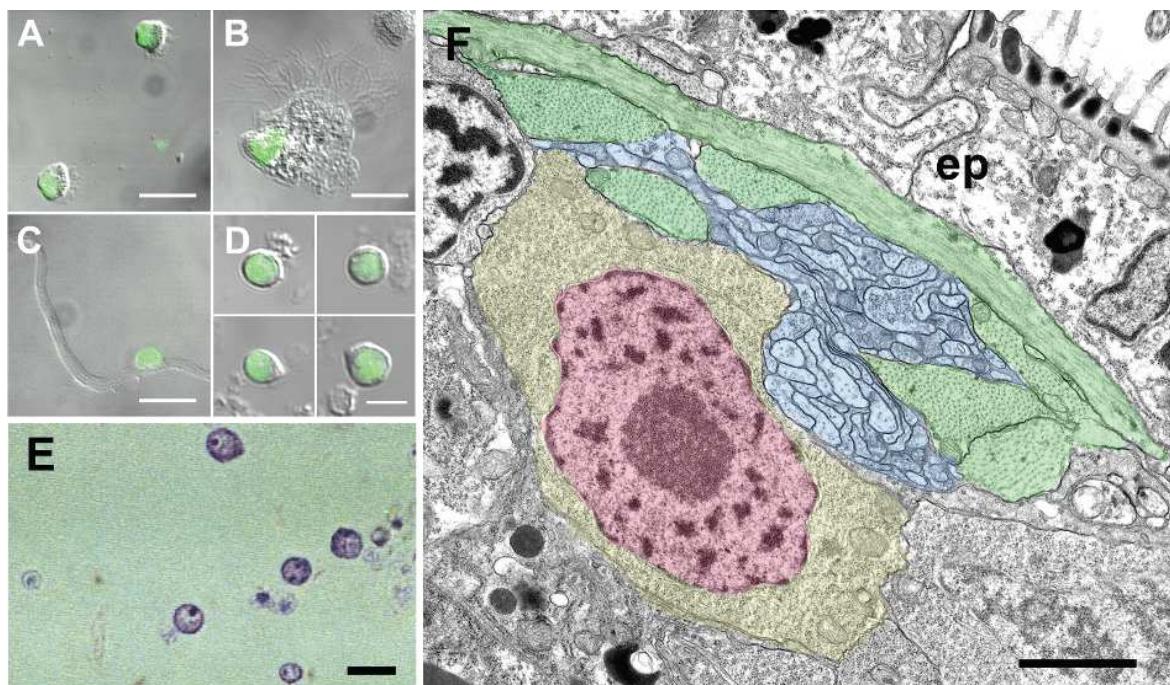


**Figure 26.** La régénération chez *Macrostomum lignano*. (A) Vue générale de *Macrostomum lignano*, longueur réelle d'environ 1 mm. (B-C) Dynamique cellulaire de la régénération. (B) Régénération d'une extrémité suite à une section en arrière de la bouche (pôle antérieur de l'animal vers la droite). Les néoblastes en phase S (marron) se concentrent au site de régénération. (C) Deux incubations espacées de 24 heures avec des analogues de la thymidine de couleurs différentes montrent la prolifération des néoblastes : ceux qui sont jaunes (flèches et insert) sont ceux qui se divisent suffisamment fréquemment pour avoir incorporé les deux analogues. Barres d'échelle = 25 µm. D'après Ladurner et al. (2007).

<sup>11</sup> Le néoblaste est considéré comme une synapomorphie du phylum des plathelminthes. Toutefois le néoblaste existe aussi chez les acoelomorphes, qui sont aujourd'hui exclus des plathelminthes dans la plupart des travaux de phylogénie moléculaire et dont la position au sein des Bilateria reste discutée (Baguña & Riutort 2004, Egger et al. 2009, Philippe et al. 2007).

La morphologie des néoblastes est proche de celle des hémoblastes des ascidies et des cellules souches hématopoïétiques de mammifères : un fort rapport nucléo-cytoplasmique, un nucléole proéminent et un cytoplasme contenant peu d'organites (Fig. 27F).

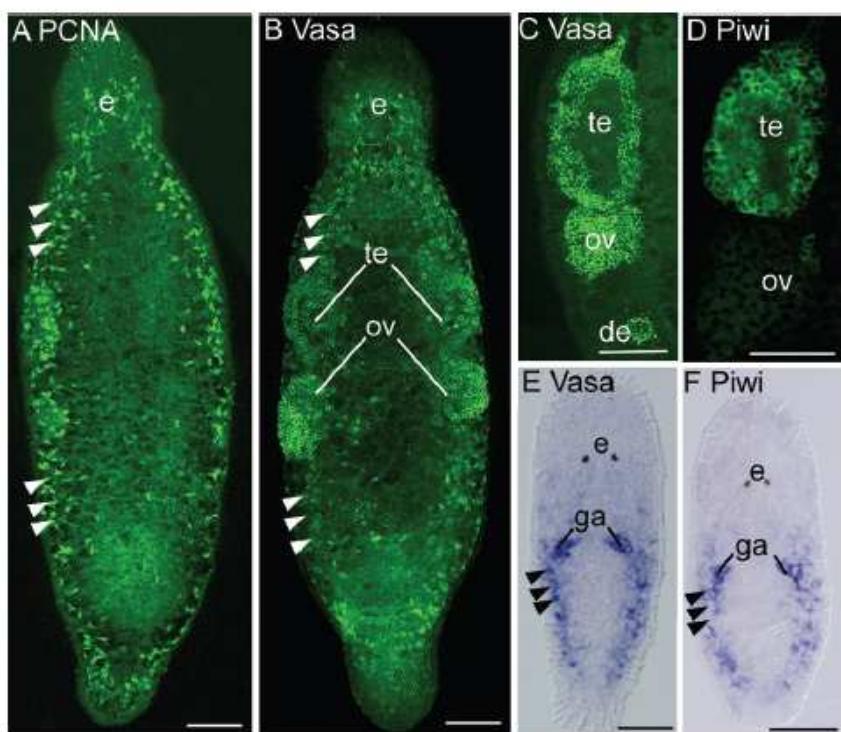
On ne trouve pas dans la littérature de démonstration directe de la capacité des néoblastes à s'auto-renouveler par division asymétrique. Mais un seul petit morceau de planaire, contenant peu de néoblastes, peut régénérer un individu entier et fonctionnel, avec ses cellules différenciées et un stock renouvelé de cellules souches. Par ailleurs, Solana et al. (2009) ont montré chez la planaire *Schmidtea polychroa* que l'inhibition du gène *Tudor* par RNAi n'empêche pas la régénération mais provoque son interruption au bout de plusieurs semaines : les auteurs en déduisent que l'inactivation de la protéine Tudor n'a pas d'effet sur la prolifération et la différenciation des néoblastes, mais sur leur auto-renouvellement.



**Figure 27.** Morphologie et descendance des néoblastes de *Macrostomum lignano*. (A-D) Cellules provenant de la différenciation de néoblastes dont les noyaux ont été marqués (en vert) par une incubation avec du BrdU. (A) Cellule de l'épiderme. (B) Cellule intestinale. (C) Cellule musculaire. (D) Néoblastes après un pulse de BrdU de 30 min. (E) Suspension de néoblastes à partir d'un fragment de planaire dilacéré. (F) Ultrastructure d'un néoblaste : le noyau coloré en rouge contient un nucleole et de la chromatine condensée. Le volume de cytoplasme (jaune) est peu important. En bleu : cordon nerveux latéral, en vert : muscle. ep : épithélium. Barres d'échelle A-E = 10 µm ; F = 2 µm. D'après Ladurner et al. (2007).

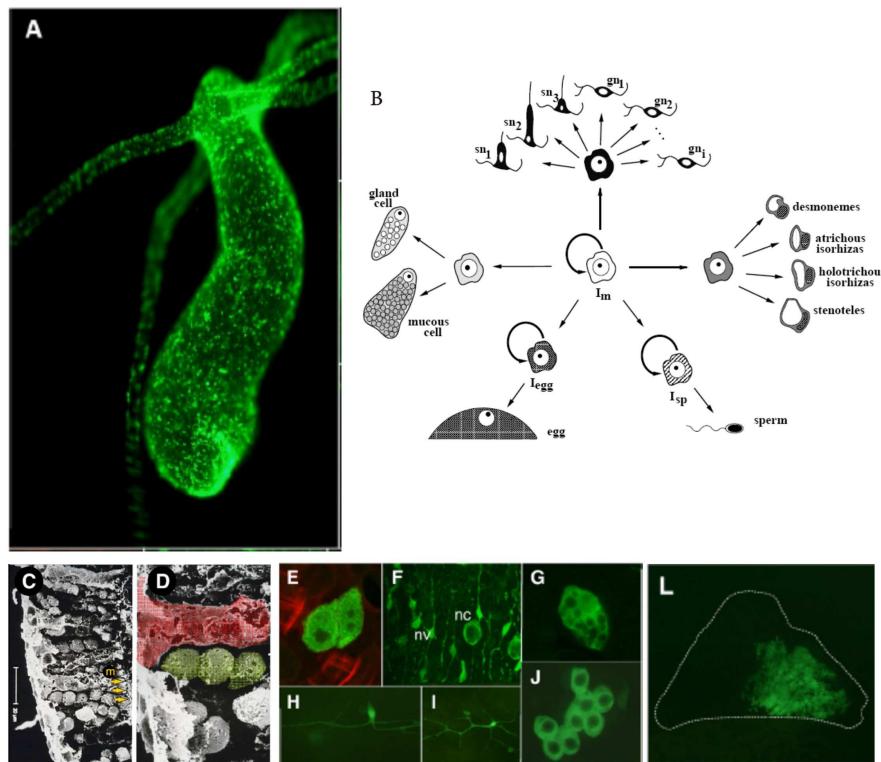
Chez *Macrostomum lignano* - planaire du groupe des Macrostomidae - les gènes *Piwi* et *Vasa* sont exprimés non seulement dans les gonades mais également dans les néoblastes (Fig. 28) (Ladurner et

al. 2007 ; Pfister et al. 2008). L'expression de ces gènes disparaît après une exposition aux rayons gamma ou après un jeûne prolongé, deux conditions empêchant la division cellulaire et conduisant à la disparition des néoblastes (Pfister et al. 2007 ; Pfister et al. 2008). A l'inverse, lors des épisodes de régénération, *Vasa* est fortement exprimé dans la zone de prolifération cellulaire (Pfister et al. 2008). Des études similaires ont été menées chez un autre groupe de planaires, les triclades. Chez l'espèce *Dugesia japonica*, les néoblastes expriment les gènes *PL10* et *Piwi* (Shibata et al. 1999 ; Shibata et al. 2010), et chez *Schmidtea mediterranea*, ils expriment les gènes *Piwi* (Reddien et al. 2005) et *Bruno* (Guo et al. 2006). L'inactivation d'un des paralogues de *Piwi* chez *S. mediterranea* empêche les néoblastes de régénérer les parties manquantes après une ablation (Reddien et al. 2005). L'inactivation de la protéine *Bruno* par ARN interférence n'empêche pas l'initiation de la prolifération, mais celle-ci s'interrompt au bout de plusieurs jours. *Bruno* est donc impliqué dans le maintien de la population de néoblastes (Guo et al. 2006).



**Figure 28.** Localisation des protéines et des ARN de *Piwi* et *Vasa* dans les gonades et les néoblastes de *M. lignano*. **(A)** vue dorsale des cellules proliférantes marquées par un anticorps anti-PCNA. **(B)** vue dorsale des cellules marquées par un anticorps anti-Vasa. Dans (A) et (B), des néoblastes sont indiqués par les têtes de flèches. **(C-D)** Localisation des protéines *Vasa* et *Piwi* dans les gonades. **(E-F)** Hybridation *in situ* dans des jeunes planaires montrant les transcrits de *Vasa* et *Piwi* dans les gonades en formation (**ga**) et dans les néoblastes (têtes de flèche). **e** : yeux, **ov** : ovaire, **t** : testicule. Barre d'échelle = 75 µm. D'après Ladurner et al. (2007).

### 2.2.3. Les cellules interstitielles des hydrozoaires



**Figure 29.** Cellules interstitielles transgéniques exprimant la GFP. **(A)** Distribution des cellules interstitielles et de leurs dérivés sur tout le corps de l’hydre. **(B)** Les cellules interstitielles peuvent s’auto-renouveler et donner les gamètes femelles (**Iegg**) et mâles (**Isp**), les cellules sécrétrices (gland cell et mucous cell), les neurones sensoriels (**sn**) et ganglionnaires (**gn**), et les cnidocytes (de types desmonème, isorhizes, sténotèle). **(C, D)** Image de microscopie électronique à balayage montrant la niche des cellules interstitielles. **(E-L)** Les dérivés des cellules interstitielles. **(E)** Cellules interstitielles indifférenciées (muscles marqués en rouge par la Rodamin-Phalloïdin). **(F)** cellules nerveuses (**nv**) et nématocytes (**nc**). **(G)** Cellule glandulaire. **(H)** Cellule neuro-sensorielle. **(I)** Neurone multipolaire. **(J)** cluster de nématocytes en différenciation. **(L)** Spermatogonies. **sn** : neurones sensoriels, **gn** : neurone ganglionnaire. Sources : **(A, C-L)** D’après Kalthurin et al. (2007) ; **(B)** D’après Bode (1996).

Localisées dans l’ectoderme chez l’adulte, les cellules interstitielles des hydrozoaires sont des cellules multipotentes capables de donner à la fois des dérivés germinaux (gamètes mâles et femelles) et somatiques (cellules nerveuses et sensorielles, cnidocytes, cellules glandulaires) (Fig. 29B) (Bode 1996 ; Galliot et al. 2006 ; Bosch 2010 ; Bosch et al. 2010). Ces cellules ont été décrites pour la première fois chez l’hydre à la fin du dix-neuvième siècle, mais c’est à partir des années 50 que des expériences de suivi de ces cellules ont permis de démontrer leur multipotence. D’abord avec des produits toxiques, puis plus récemment en utilisant des clones thermosensibles, il est possible de débarrasser une hydre de ses cellules interstitielles : on parle alors d’hydre épithéliale. Par ailleurs,

après dissociation totale, les cellules d'hydre ont la capacité de se ré-agréger avant de présenter une phase de régénération conduisant à un individu tout à fait normal. Cette particularité a permis de mélanger les cellules d'une hydre épithéliale, avec celles d'une hydre normale, dans des proportions telles que l'on obtient statistiquement une seule cellule interstitielle dans l'hydre hôte (Fig. 30). Ainsi l'on a pu montrer qu'un clone unique de cellule interstitielle de l'hydre est capable de donner des dérivés germinaux, mais aussi des cellules somatiques (David & Murphy, 1977 ; Bosch & David, 1987 ; Schmidt & David 1986) (pour une excellente revue sur les cellules interstitielles et la lignée germinale des hydrozoaires, voir la thèse de Lucas Leclère, 2008).

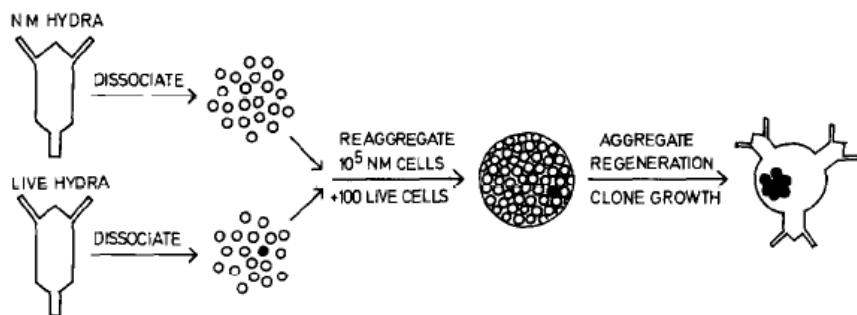
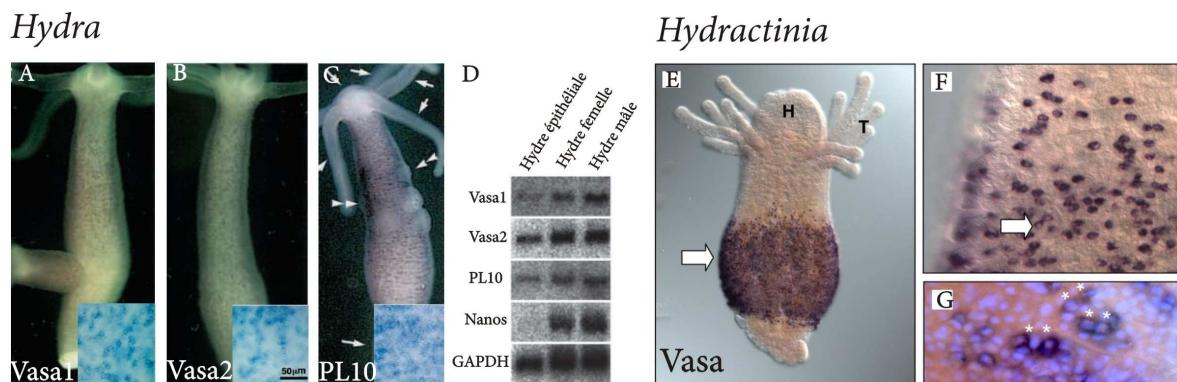


Figure 30. Représentation schématique du clonage de cellules interstitielles (point noir) d'une hydre sauvage sur une hydre épithéliale (traitée à la moutarde azotée = NM). D'après David & Murphy (1977).

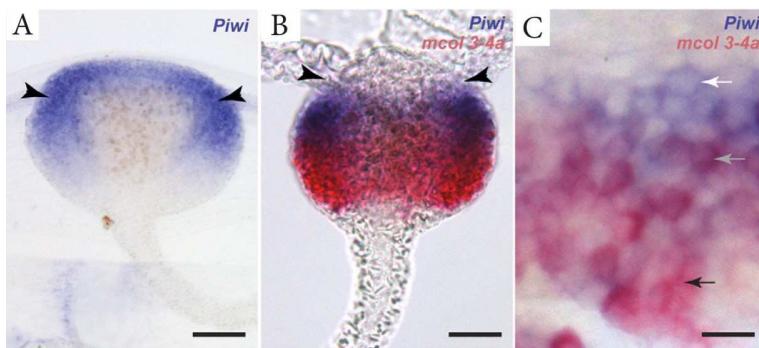
On a peu de connaissances sur les modalités exactes de l'auto-renouvellement des cellules interstitielles, et notamment sur l'asymétrie éventuelle de leur division. Mais, comme dans le cas des planaires que l'on a vu plus haut, un faible nombre de ces cellules souches peut non seulement donner divers dérivés mais également reconstituer la population de cellules souches d'un hôte greffé, et ce de façon stable (démontré par transgénèse, Khalturin et al. 2007). Les cellules interstitielles ont donc à la fois une forte capacité de prolifération et de différenciation. Par ailleurs, chez *Hydra*, les cellules épithéliales de l'ectoderme et l'endoderme sont capables de proliférer pour assurer l'homéostasie de ces feuillets (les cellules interstitielles ne donnent pas d'endoderme ni de cellules épithélio-musculaires chez cette espèce), ce sont donc des cellules différencierées assurant une fonction de cellule souche (Bosch et al. 2010).

Les cellules interstitielles seraient contenues dans une niche formée par les cellules épithéliales palissadiques (Khalturin et al. 2007 ; Fig. 29C, D). Par ailleurs, la voie Wnt/Beta Catenin pourrait être impliquée dans la balance entre prolifération et différenciation des cellules interstitielles des hydrozoaires, en réprimant la différenciation (Khalturin et al. 2007 ; Teo et al. 2005). Le rôle de la niche dans le contrôle des cellules souches de l'hydre est une voie de recherche dont l'exploration est très prometteuse (Bosch et al. 2010).

Les gènes *Piwi*, *Vasa*, et *PL10* sont exprimés dans les cellules germinales ainsi que dans les cellules interstitielles de différentes espèces d'hydrozoaires. *Hydra magnipapilatta* possède deux paralogues du gène *Vasa*, et un orthologue de *PL10* (Mochizuki et al. 2001), qui sont tous les trois exprimés dans les cellules interstitielles (Fig. 31A-C). De plus leur expression dans les hydres épithéliales (Fig. 31D) suggère qu'ils sont également exprimés dans les cellules souches ectodermiques et endodermiques. Le gène *Piwi* est exprimé dans la larve de *Podocoryne carneae* selon un pattern qui évoque fortement un marquage dans les cellules interstitielles (Seipel et al. 2004). *Vasa* est exprimé dans les cellules interstitielles du polype d'*Hydractinia echinata* (Fig. 31E-G). Chez *Clytia hemisphaerica*, *Piwi* est exprimé dans les cellules interstitielles du bulbe tentaculaire (Fig. 32) et dans les gonades (Denker et al. 2008a ; Leclerc 2008). Les cellules interstitielles du bulbe tentaculaire sont supposées ne donner que les dérivés somatiques constituant le tentacule (parmi lesquels les nématocytes).



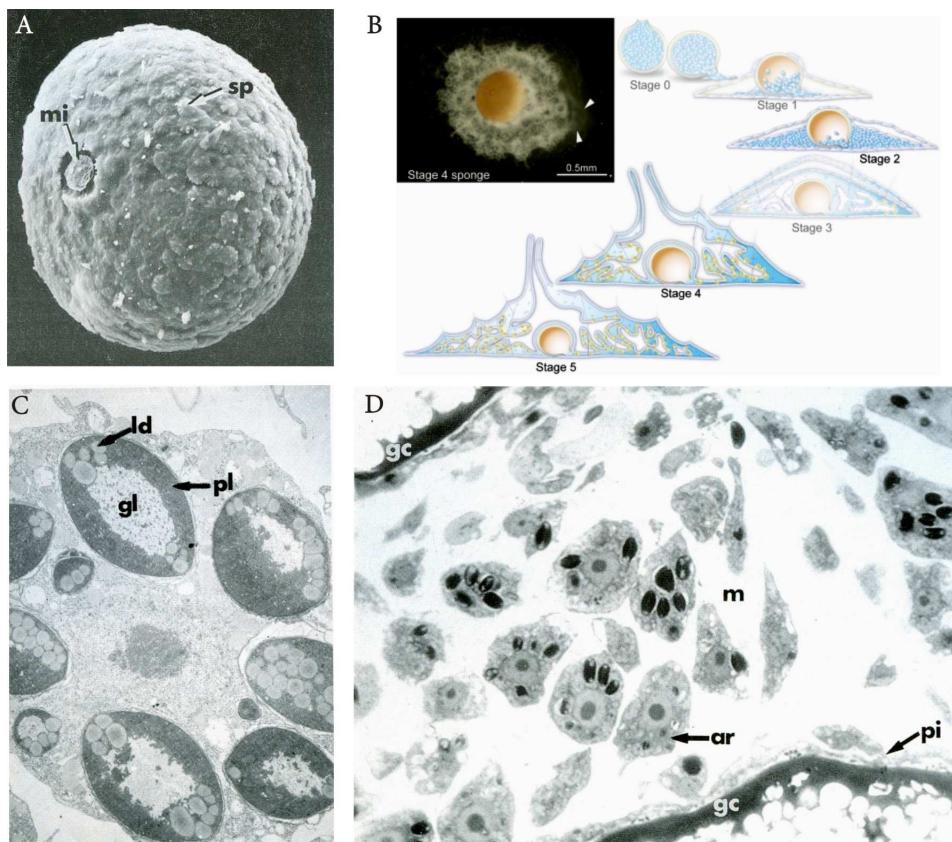
**Figure 31.** Expression de *Vasa* et *PL10* chez les hydrozoaires. (A-C) Expression de *Vasa1*, *Vasa2* et *PL10* dans le polype d'*Hydra magnipapillata*, les inserts montrant les cellules interstitielles marquées. (D) Northern blot montrant que *Vasa 1*, *Vasa2* et *PL10* sont également exprimés dans les hydres épithéliaux. *Nanos* n'est pas exprimé dans les hydres épithéliaux. (E-G) Expression de *Vasa* chez *Hydractinia echinata*. (F,G) Détail des cellules marquées. **H** : hypostome, **T** : tentacule.  
Sources : (A-D) D'après Mochizuki et al. (2001) ; (E-G) D'après Rebscher et al. (2008).



**Figure 32.** Expression de *Piwi* dans les cellules interstitielles du bulbe tentaculaire de la méduse *Clytia hemisphaerica*. (A). Hybridation *in situ* montrant l'expression de *Piwi*. (B) Double ISH *Piwi* + *mcol* (marqueur de nématoblastes en différenciation). (C) agrandissement montrant une régionalisation entre les cellules souches interstitielles n'exprimant que *Piwi* (bleu, flèche blanche), les cellules en début de différenciation exprimant *Piwi* et *mcol* (violet, flèche grise) et les cellules exprimant *mcol* uniquement (rouge, flèche noire). Têtes de flèche : insertion du bulbe sur la marge de l'ombrelle. Barres d'échelle = 25 µm.  
D'après Denker et al. (2008a).

## 2.2.4. Les archéocytes de démosponges

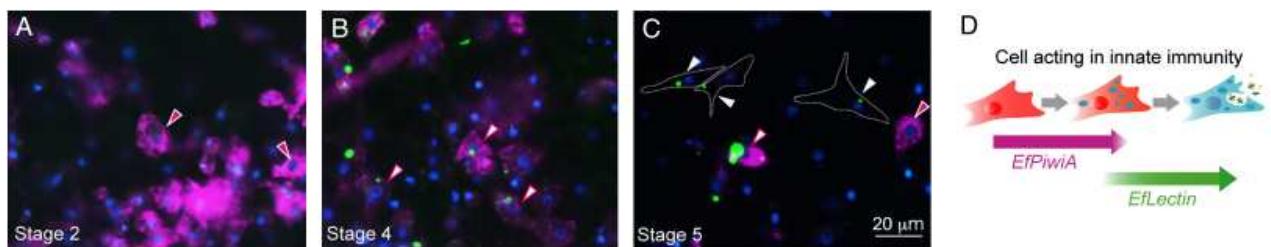
Les archéocytes sont des cellules totipotentes, capables de donner tous les types cellulaires d'éponge. Ils possèdent un gros noyau nucléolé, et leur cytoplasme est rempli de phagosomes, qu'ils acquièrent en phagocytant d'autres cellules, les trophoblastes (de Vos et al. 1991) (Fig. 33C). Bien qu'ils soient dispersés dans tout le mésohyle de l'éponge, les archéocytes sont en plus forte concentration près des zones de cicatrisation, de régénération ou de croissance. Ils jouent notamment un rôle prépondérant dans les phénomènes de reproduction asexuée chez les éponges.



**Figure 33.** La gemmulation d'*Ephydatia fluviatilis*. (A) Vue en microscopie électronique à balayage d'une gemmule. On peut y voir le micropyle (**mi**) par lequel la gemmulation va avoir lieu, et qui est ici fermé. La gemmule est couverte de spicules (**sp**). (B) Les différents stades de la gemmulation. Stades 0 à 2 : prolifération des archéocytes et mise en place d'une enveloppe épithéliale. Stade 3 : différenciation des archéocytes. Stade 4 : Formation des oscules pour créer une éponge fonctionnelle. Stade 5 : Expansion de l'éponge. La photo montre une éponge au stade 4. (C) Archéocyte contenant des plaquettes vitellines (**pl**) (microscope électronique à transmission). (D) Vue au microscope optique d'une très jeune éponge, juste après la gemmulation. Plusieurs archéocytes (**ar**) ont commencé à digérer leur réserves. **ar** : archéocyte, **gc** : enveloppe de la gemmule, **gl** : glycogène, **ld** : gouttelettes lipidiques, **m** : mésohyle, **pi** : pinacoderme, **pl** : plaquette vitelline. Sources : (B) Funayama et al. (2010) ; (A, C, D) Harrison & De Vos (1991).

En effet, les éponges se reproduisent principalement par reproduction sexuée, mais certaines espèces se dispersent également par différents types de reproduction asexuée : par bourgeonnement, par fission ou par des « stolons » (une excroissance d'une partie d'un individu devenant autonome de son éponge mère) (Harrison & de Vos 1991). Les éponges d'eau douce (Demosponges Spongillidae) comme par exemple *Ephydatia fluviatilis* produisent des gemmules qui sont des formes de résistance contenant uniquement des cellules souches, protégées par une enveloppe acellulaire (Fig. 33A). Les archéocytes accumulent des réserves puis migrent pour constituer la gemmule lors de sa formation. Chez *Ephydatia*, ils deviennent alors binucléés et entrent en dormance : on les appelle des thésocytes. Lorsque les conditions deviennent favorables, la gemmule germe (phénomène de gemmulation) (Fig. 33B). Les thésocytes entrent alors en prolifération, pour donner des archéocytes dont les réserves s'amenuisent et qui se différencient pour donner tous les types cellulaires de la nouvelle éponge (Fig. 33B, D).

Les archéocytes d'*Ephydatia fluviatilis* expriment un orthologue de la famille Piwi et l'expression de ce gène disparaît à mesure que l'archéocyte se différencie (Fig. 34) (Funayama et al. 2010) (sauf quand il se différencie en choanocyte). On peut noter que Piwi est également exprimé dans les choanocytes, cellules flagellées qui créent le courant d'eau dans l'éponge, et sont également capable de se trans-différencier pour donner des spermatozoïdes et des archéocytes. Piwi serait donc lié aux deux système de cellules souches (archéocytes et choanocytes) chez les éponges (Funayama et al. 2010, Funayama 2010).



**Figure 34.** Transition de l'expression de *Piwi* (en rose) dans les archéocytes, vers l'expression de *Lectin* (en vert) marqueur spécifique de cellules de l'immunité entre les stades 2 et 5 de la gemmulation. (A) Un archéocyte exprimant *Piwi*. (B) Des cellules co-exprimant *Piwi* et *Lectin* (flèches blanches bordées de rouge). (C) Plusieurs cellules expriment uniquement *Lectin* (flèches blanches). (D) Schéma du processus de transition entre un archéocyte et une cellule immunitaire. *D'après Funayama et al. (2010)*.

## 2.3. Etude de l'expression de *Piwi*, *Vasa*, *PL10* et *Bruno* chez l'adulte du cténaire *Pleurobrachia pileus*

### 2.3.1. Objectifs du travail présenté dans l'article 1

Nous venons de voir que des orthologues des gènes *Vasa*, *Piwi*, *Bruno* et *PL10* sont exprimés chez diverses lignées de métazoaires dans des cellules souches multipotentes, celles-ci pouvant donner à la fois des dérivés somatiques et des dérivés germinaux. Ces résultats conduisent à deux hypothèses alternatives que notre travail sur *Pleurobrachia pileus* a pour objectif de tester.

Selon la première hypothèse, cette combinatoire de gènes serait fondamentalement liée au potentiel germinal des cellules qui l'expriment. Dans cet esprit, Rebscher et al. (2007), à partir de leur étude sur l'annélide *Platynereis dumerelii*, proposent un modèle de spécification de la lignée germinale en deux temps, impliquant dans un premier temps l'expression de *Vasa* au sein d'un stock de cellules multipotentes, puis la restriction de son expression à la lignée germinale. Selon notre première hypothèse, l'expression des « germline genes » comme *Vasa* et *Piwi* dans les néoblastes des planaires, les cellules interstitielles de cnidaires, ou encore les archéocytes d'éponges, serait liée à la potentialité qu'ont ces cellules de donner des dérivés germinaux.

Une autre façon d'interpréter ces résultats est de soutenir que cet ensemble de gènes *Vasa*, *Piwi*, *PL10*, *Bruno*, n'est pas seulement lié à la lignée germinale, mais aussi aux cellules souches, que leurs dérivés soient somatiques, germinaux ou les deux. Cette hypothèse se vérifiera si l'on peut observer l'expression de ces gènes dans des cellules somatiques qui n'ont rien à voir avec la lignée germinale. En l'état actuel des travaux publiés, seules quelques données montrent l'expression, dans des cellules souches purement somatiques, de *Piwi* chez les Bilateria (Sharma et al. 2001 ; Wu et al. 2010 ; Cox et al. 2000) et de *Vasa* et *Piwi* chez les cnidaires (on a vu plus haut les exemples du bulbe tentaculaire de *Clytia hemisphaerica* et des hydres épithéliales).

Le cténaire *Pleurobrachia pileus* est un modèle adéquat pour faire pencher la balance du côté de l'une ou de l'autre de ces hypothèses. D'une part, bien évidemment, du fait de sa position phylogénétique clef. D'autre part, comme nous l'avons vu en introduction (§ 1.1.4.), *Pleurobrachia* possède dans sa racine tentaculaire des populations localisées de cellules souches spécialisées dans la production de dérivées somatiques, décrites depuis le XIX<sup>em</sup> siècle (Chun 1880 ; Benwitz 1978 ; Franc 1985).

L'expression de *Vasa*, *Piwi*, *PL10* et *Bruno* dans ces cellules souches somatiques serait en faveur de la seconde hypothèse.

L'autre objectif de ce travail est également de découvrir et de caractériser de nouvelles populations de cellules souches chez *Pleurobrachia*. Cet animal a de fortes capacités de régénération, mais également il grandit durant une bonne partie de sa vie adulte. Nous avons donc de bonnes raisons d'espérer qu'en combinant une étude de la dynamique de division des cellules (par marquage avec l'EdU), avec de nouvelles observations en microscopie électronique, nous devrions être en mesure de localiser d'autres cellules souches et d'établir si elles expriment ou non les gènes *Vasa*, *Piwi*, *Bruno* et *PL10*.

### 2.3.2. Résumé des résultats et conclusions de l'article 1

Nous avons étudié l'expression de *Vasa*, de *Bruno*, de *PL10* et de deux paralogues de *Piwi* chez le cténaire *Pleurobrachia pileus*. Ces gènes sont tous exprimés dans les lignées germinales mâle et femelle, et ont également le même patron d'expression dans plusieurs territoires somatiques (mis à part l'un des paralogues de *Piwi*). Nous avons établi que ces territoires correspondent à des zones où se trouvent concentrées des cellules souches, et ce grâce à des observations ultrastructurales, ainsi qu'à la mise en évidence de l'incorporation et de la rétention à long terme de l'EdU dans ces cellules. Ces pools de cellules souches, strictement somatiques, sont spatialement isolés et dévolus à la production de types cellulaires différents. Ces données apportent de nouvelles informations importantes concernant le renouvellement cellulaire en lien avec l'organisation de *Pleurobrachia pileus*. Ils suggèrent par ailleurs que les gènes *Vasa*, *Piwi*, *PL10* et *Bruno* appartiennent à une combinatoire impliquée ancestralement dans deux aspects de la biologie des eumétazoaires : (i) la lignée germinale, et (ii) les cellules souches, quelle que soit la nature de leurs dérivés.

Cet article est actuellement accepté sous réserve de modifications mineures dans le journal *Developmental Biology*. Je présente ici une version révisée d'après les suggestions des reviewers

### **2.3.3. Article 1 : « Somatic stem cells express Piwi and Vasa genes in an adult ctenophore : ancient association of “germline genes” with stemness »**

Alexandre Alié<sup>a</sup>, Lucas Leclère<sup>a, b</sup>, Muriel Jager<sup>a</sup>, Cyrielle Dayraud<sup>a</sup>, Patrick Chang<sup>c</sup>, Hervé Le Guyader<sup>a</sup>, Eric Quéinnec<sup>a</sup>, Michaël Manuel<sup>a</sup>\*

<sup>a</sup> Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, UMR 7138 CNRS MNHN IRD, Case 05, 7 quai St Bernard, 75005 Paris, France.

<sup>b</sup> Sars International Centre for Marine Molecular Biology, University of Bergen, N-5008 Bergen, Norway (present address).

<sup>c</sup> Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, UMR 7009 CNRS, Observatoire Océanologique, 06230 Villefranche-sur-Mer, France.

\* Corresponding author.

E-mail address: [michael.manuel@snv.jussieu.fr](mailto:michael.manuel@snv.jussieu.fr) (M. Manuel).

## **Abstract**

Stem cells are essential for animal development and adult tissue homeostasis, and the quest for an ancestral gene fingerprint of stemness is a major challenge for evolutionary developmental biology. Recent studies have indicated that a series of genes, including the transposon silencer Piwi and the translational activator Vasa, specifically involved in germline determination and maintenance in classical bilaterian models (e.g. vertebrates, fly, nematode), are more generally expressed in adult multipotent stem cells in other animals like flatworms and hydras. Since the progeny of these multipotent stem cells includes both somatic and germinal derivatives, it remains unclear whether Vasa, Piwi, and associated genes like Bruno and PL10, were ancestrally linked to stemness, or to germinal potential. We have investigated the expression of Vasa, two Piwi paralogues, Bruno and PL10 in *Pleurobrachia pileus*, a member of the early-diverging phylum Ctenophora, the probable sister-group of cnidarians. These genes were all expressed in the male and female germlines, and with the exception of one of the Piwi paralogues they showed similar expression patterns within somatic territories (tentacle root, comb rows, aboral sensory complex). Cytological observations and EdU DNA-labelling and long-term retention experiments revealed concentrations of stem cells closely matching these gene expression areas. These stem cell pools are spatially restricted and each specialised in the production of particular types of somatic cells. These data unveil important aspects of cell renewal within the ctenophore body, and suggest that Piwi, Vasa, Bruno and PL10 belong to a gene network ancestrally acting in two distinct contexts: (i) the germline and (ii) stem cells, whatever the nature of their progeny.

## **Keywords**

Ctenophore, Evolution, Germline, Piwi, Stem cell, Vasa.

## Introduction

Stem cells are fundamental for embryonic development and cell renewal during growth and regeneration and are present across all phyla of multicellular animals (Metazoa), but whether animal stem cells share a molecular signature inherited from a common ancestor remains unanswered. Comparative genomic analyses have provided a first glimpse into this question by demonstrating that many genes with functions in stem cells of vertebrates or *Drosophila* are phylogenetically conserved in early-branching metazoan phyla like cnidarians and sponges (Hemmrich and Bosh, 2008). However, this does not necessarily imply stem cell functions for these genes in non-bilaterians animals as in conventional bilaterian models. Furthermore, the notion of “stem cell genes” is not straightforward. For example, paracrine Wnt signalling controls the balance between self-renewal and differentiation in many *Drosophila* and vertebrate stem cell systems (Fleming et al., 2008) as well as in hydrozoan interstitial stem cells (Khalturin et al., 2007), but this pathway is also involved in a vast array of other contexts and therefore is not specific for stem cells. Comparative transcriptomic studies have attempted to identify common genes expressed across stem cells of various types, but these next-generation studies have mainly focused on model systems, particularly mammalian stem cells. Ivanova et al. (2002) and Ramalho-Santos et al. (2002) identified about 250 core genes co-expressed in hematopoietic stem cells, neural stem cells, and embryonic stem (ES) cells, some being conserved between human and rat (e.g. Ercc genes involved in DNA repair, or the transcription regulators Fhl), but neither the specificity of these genes for stems cells, nor their conservation outside mammals have been addressed in these studies. Finally, a conserved molecular fingerprint ancestrally linked to animal stemness remains to be uncovered.

Recently, the study of non-conventional models, like planarians, acoels or hydrozoans, have highlighted a group of genes, previously known as germline markers in classical models (e.g. *Drosophila*, vertebrates), that appear to be expressed in multipotent stem cells across phyla. The most extensively studied of these genes are Vasa and Piwi. Vasa is a DEAD-box RNA helicase exclusively expressed in the germline in *Drosophila*, vertebrates and nematode, and promoting translation of other germline genes (Castrillon et al., 2000; Raz, 2000; Liu, N. et al., 2009; Gustafson & Wessel 2010). Piwi genes belong to the Piwi/Argonaute family, highly

conserved across eukaryotes and characterised by their PAZ and PIWI domains. Piwi proteins bind specific micro-RNAs, called piRNA (for Piwi interacting RNAs). The main function of the Piwi machinery is genome protection by transposon silencing (Vagin et al., 2006; Aravin et al., 2007; Thomson and Lin, 2009; Tang, 2010; Siomi et al., 2010). Other roles of Piwi include epigenetic regulation of transcriptional activity (Yin & Lin, 2007; Thomson and Lin, 2009). There are important interactions between Piwi and Vasa in the germline. In mouse, Vasa binds to the Piwi paralogues MIWI and MILI (Thomson and Lin, 2009). In *Drosophila*, Piwi and Vasa proteins co-localise in the germ plasm, over-expression of Piwi causes increase in Vasa protein level (Gustafson and Wessel, 2000), and Vasa is involved in piRNA retrotransposon silencing (Vagin et al., 2004).

Piwi and Vasa are members of a wider regulatory network involved in germ stem cell maintenance, germline specification and differentiation in vertebrates and *Drosophila*. This network includes for example (among other genes like nanos, pumilio, Tudor...) the DEAD-box RNA helicase PL10, closely related to Vasa, and the RRM domain-containing RNA-binding protein Bruno. In mammals, PL10 (also called DDX3) is essential for normal differentiation during spermatogenesis (Abdelhaleem, 2005). Johnstone et al. (2005) showed the essential role of the PL10 orthologue (*Bel*) in *Drosophila* fertility, and the reduction of its localisation to the germ plasm in a *Vasa* mutant. In *Drosophila*, Bruno regulates multiple mRNAs involved in male and female gametogenesis, and the Bruno protein physically interacts with Vasa (Webster et al., 1997).

In a number of other animal lineages, this gene combination is not restricted to the germline but tends to be expressed in multipotent stem cells that are capable of producing both somatic and germinal derivatives. For instance, Piwi orthologues are expressed in sponge archaeocytes and choanocytes (Funayama et al., 2010; Funayama, 2010), in interstitial stem cells of the hydrozoan *Podocoryne* (Seipel et al., 2004), and in the neoblasts of acoels (De Mulder et al., 2009a) and planarians (Reddien et al., 2005; De Mulder et al., 2009b). Vasa is expressed in interstitial cells of *Hydra* and *Hydractinia* (Mochizuki et al., 2001; Rebscher et al., 2008), in planarian neoblasts (Agata et al., 2006; Pfister et al., 2008) and in putative multipotent stem cells of the colonial tunicate *Botryllus* (Rosner et al., 2009). PL10 and Bruno are expressed in planarian neoblasts (Shibata et al., 1999; Guo et al., 2006). Piwi, Vasa and PL10 are

expressed altogether at the posterior growth zone in *Platynereis* larvae (Rebscher et al., 2007), in stem cells providing somatic and germinal derivatives.

These data suggest two alternative hypotheses: (i) these genes are fundamentally associated with germinal potential, and when they are expressed in multipotent stem cells it is because they have the potential to generate germ cells; (ii) these genes are components of an ancestral molecular toolkit of animal stem cells, whatever the fate of their progeny. In order to test these hypotheses, it would be desirable to investigate the expression of the gene combination in early-branching animals that possess strictly somatic stem cells, because these stem cells would be expected to express Piwi, Vasa and others under the second scenario but not under the first.

Among the early-branching animal lineages (i.e. phylogenetically positioned outside from the Bilateria), the phylum Ctenophora has not been investigated in terms of the molecular mechanisms linked to stem cells and to the germline. The phylogenetic position of ctenophores is still a debated question. Some recent phylogenomic analyses placed them as the sister group to all other extant metazoans (Dunn et al., 2008; Hejnol et al., 2009), a result probably due to a long-branch attraction artifact (Philippe et al., 2009; Pick et al., 2010). In Philippe et al. (2009), ctenophores form with cnidarians a coelenterate clade, grouped with bilaterians in the Eumetazoa (animals with nerve and muscle cells). Whatever their exact placement in the tree, ctenophores are a pivotal group for understanding the early evolution of fundamental developmental processes. Therefore, we decided to investigate the expression of Piwi, Vasa, Bruno and PL10 in the cydippid ctenophore *Pleurobrachia pileus*, a species amenable to gene expression studies in the adult (Derelle & Manuel, 2007; Jager et al., 2008).

The ctenophore body features unique anatomical traits, strongly departing from those of their cnidarian sister group (Brusca & Brusca, 2003; Hernandez-Nicaise, 1991). Their gastro-vascular system opens at one extremity by the mouth, and at the other by two anal pores. This gastro-vascular system has a dual embryonic origin, consisting of an ectodermal pharynx and of endodermal components, the infundibulum (stomach) and ramified canals distributing nutrients throughout the entire body (Fig. 1A). Among these, eight longitudinal meridional canals run from the oral to the aboral pole of the animal and house the gonads (Fig. 1A).

Ctenophores are hermaphrodite and each meridional canal contains separate female and male gonads. *Pleurobrachia pileus* does not reproduce asexually in contrast to other early-branching metazoan model organisms. Ctenophores swim thanks to eight conspicuous longitudinal rows of ectodermal ciliated plates (combs) made of the agglomerated cilia of “polster cells”. At its aboral pole, *Pleurobrachia* possesses a hemispherical apical organ involved in equilibration, flanked by two elongated ciliated areas, the polar fields (Fig. 1A). Our immunocytochemical observations (Jager et al. submitted) have highlighted the anatomical complexity of the apical organ and polar fields in terms of neuro-sensory cell types and their distribution.

*Pleurobrachia*, like other cydippid ctenophores, bears a pair of tentacles used for catching prey (mostly planktonic crustaceans). Previous histological investigations (Hertwig, 1880; Chun, 1880; Bentwitz, 1978; Franc, 1985; Hernandez-Nicaise, 1991) have described spatially localised populations of stem cells/undifferentiated progenitors, within the tentacle basal thickening (or tentacle root, Fig. 1A), supplying cells for tentacle regeneration. Epithelial stem cells provide the colloblasts (adhesive cells) and mesodermal-like stem cells provide the tentacle muscle cells. This regeneration process is continuous, as during the entire ctenophore adulthood, tentacles are injured or destroyed during the process of prey catching. The tentacle root is also responsible for the production of tentillae, lateral branching that increase the tentacle apparatus surface (Fig. 1A). The existence in the tentacle root of stem cells specialised in the production of particular somatic cell types makes ctenophores a particularly relevant group for evaluating the two hypotheses presented above, i.e. whether Piwi, Vasa and others are ancestrally associated with germinal potential or with stemness.

We studied the expression of Vasa, Piwi, PL10 and Bruno in the adult *Pleurobrachia pileus*. These genes were all expressed in the germline, but also in several localised cell populations within somatic territories, including the tentacle root. Within all these gene-expressing areas we detected (i) cells with undifferentiated phenotypes based on TEM observation and DAPI staining of nuclei, (ii) cell proliferation based on incorporation of the thymidine analogue ethynyl deoxyuridine (EdU) and (iii) long-term label (EdU) retention, providing strong evidence for the presence of slow-cycling stem cells. These results provide indications that ancestrally in eumetazoans Piwi, Vasa and other so-called “germline genes” were linked not

only to the germline but also to stem cells whatever the nature of their progeny. In addition, the present work illustrates how studies using ctenophores can renew our understanding of the early evolution of adult cell renewal systems.

## Materials and Methods

### *Blast searches and phylogenetic analyses*

EST sequencing for *Pleurobrachia pileus* (~36,000) was performed at the Genoscope (Evry, France) from a normalised cDNA library, constructed by Express Genomics from microgram quantities of total RNA extracted from mixed embryonic, larval, and adult stages. Starting material was obtained from Villefranche-sur-Mer. The *Pleurobrachia pileus* EST data have been made publicly available in dbEST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide?term=pleurobrachia>). The ESTs have been assembled using Phrap to give a total of 8936 contigs and singletons (assembly available upon request). The assembled mRNA sequences of the five genes studied here have been included in the Genbank database under the following Accession Numbers (...).

Ctenophore sequences similar to Piwi, Vasa, Bruno and PL10 were obtained by TBLASTN searches using *Drosophila* sequences on the *P. pileus* EST assembly. Alignments were constructed using published sequences and sequences retrieved by TblastN searches on public databases for a representative taxon set (see Supplementary data). Sequences were aligned using MUSCLE (Edgar, 2004). Alignments were slightly corrected manually to eliminate major mistakes. Ambiguous regions were identified by visual inspection and removed manually, and positions containing more than 80% of missing data were deleted. These final alignments are provided as Supplementary data. Maximum-Likelihood (ML) analyses were performed using the PhyML program (Guindon & Gascuel, 2003), with the WAG model of amino-acid substitution and a BioNJ tree as the input tree. A gamma distribution with four discrete categories was used in these ML analyses. The gamma shape parameter and the proportion of invariant sites were optimised during the searches. The statistical significance of the nodes was assessed by bootstrapping (200 replicates).

### *Specimen collection*

Adult specimens of *Pleurobrachia pileus* were collected in Villefranche-sur-mer, Roscoff and Gravelines during their reproduction period (March-May), with plankton nets. The stress due

to the capture induces laying of eggs and sperm. Animals were kept in 16°C sea water for 24 hrs to allow them to recover full gonads.

#### *In situ hybridisation*

*Pleurobrachia pileus* specimens were fixed in 4% PFA in 50% seawater and 50% PBST (10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150mM NaCl, pH 7.5, 0.1% Tween 20) for 1 hour at room temperature. Samples were washed three times in PBST, dehydrated through a graded series of ethanol and stored in methanol at -20°C. DIG (digoxigenin)-labelled RNA probes were synthetised from plasmids containing the clones of interest based on EST sequences, using the DIG RNA Labeling Mix (Roche, Indianapolis, USA). Insert size was determined by digestion with the appropriate restriction enzymes and found to be between 500 bp and 1.5 Kbp.

The protocol used for *in situ* hybridisation (ISH) was as described in Jager et al. (2008) but colour was developed with NBT/BCIP (Roche, Indianapolis, USA). After ISH, samples were stained with DAPI (1 µg/ml) for 30 min for DNA labelling, then washed 3x 15 min in PBST. Before mounting in Citifluor (Agar Scientific, Essex, England), animals were micro-dissected. Gonads and tentacle roots were extracted from the body for separate observation. The aboral region was isolated from the rest of the body and positioned on a slide.

#### *EdU labelling of DNA-replicating cells*

EdU (ethynyl deoxyuridine) is a thymidine analogue similar to the classical BrdU but quicker and easier to use (Chehrehsa et al., 2009). EdU incorporation assays were done using the Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Imaging Kit from Invitrogen (Durham, NC, USA). Individuals were incubated in artificial sea water containing 100 µM EdU, for different times (pulse, see below), then they were either (i) fixed in PFA 4% 50% seawater, 50% PBST (no chase) or (ii) rinsed several times in artificial seawater and left in artificial seawater for various lengths of time (chase, see below) before fixation. We performed four different combinations of pulse/chase times as follows: (1) pulse 30 min, no chase; (2) pulse 12 hrs, no chase ; (3) pulse 12 hrs, chase 24 hrs ; (4) pulse 12 hrs, chase 5 days. After fixation for 30 min at room temperature, the samples were blocked with 3% BSA in PBST, then permeabilised in

PBS triton X100 0.5% (PBST) for 20 minutes. After washing with 3% BSA in PBS, animals were incubated in EdU detection solution as indicated by the manufacturer. All samples were finally stained with DAPI (1 $\mu$ g/ml) for 15 min for DNA visualisation, then washed three times for 15 min in PBST and mounted as described for ISH experiments.

#### *Sections for photonic and electronic microscopy*

Three types of sections (cryosection, semi-thin and ultra-thin sections) were performed. For cryosectioning, tentacle roots or meridional canals extracted after whole-mount ISH were incubated for two days in PBST 15% sucrose at 4°C, then for 2 hours in PBST, 15% sucrose, 7.5% pig gelatin. Then, blocks were frozen at -65°C in 2-methyl-butan. Cryosectioning was done on a Leica CM3050 S cryostat or Jung Frigocut 2800E cryostat, at a thickness of 14  $\mu$ m. Slices were mounted in Citifluor (London, UK).

Living specimens for semi-thin and ultra-thin sections were fixed for 10 minutes in 3% glutaraldehyde, 0.1M sodium cacodylate pH 7.3, 0.3M sodium chloride, 0.05% OsO<sub>4</sub> (modified after Eisenman & Alfert, 1981). They were then transferred to the same solution without OsO<sub>4</sub> for 2 hours. A final post-fixation step was performed for 1 hour in 1% OsO<sub>4</sub>, 1.5% K-ferricyanide, 2.5% NaHCO<sub>3</sub> pH 7.2, and 0.25M sodium chloride (modified after Sun et al., 2007). Finally, material was dehydrated through ethanol series, and embedded in Spurr. Sections were done using a Leica Ultracut R ultra-microtome, at a thickness of 500 nm for semi-thin sections (coloured with toluidin blue and mounted in Eukit, Agar Scientific, Essex, England) and of 60 nm for ultra-thin sections.

#### *Imaging*

All fluorescence, DIC and semi-thin section images were acquired on an Olympus BX61 microscope using a Q-imaging Camera with Image Pro plus software (Mediacybernetics, Bethesda, MD). TEM images were acquired on a Jeol JEM-1400 Transmission Electron Microscope equipped with a Morada (SIS) camera at the “Centre Commun de Microscopie Appliquée” (CCMA) (Université de Nice Sophia Antipolis, Faculté des Sciences, Nice).

## Results

By Blast searches on *Pleurobrachia pileus* ESTs and phylogenetic analyses we could identify one orthologue of Vasa (*PpiVasa*), two paralogues of Piwi (*PpiPiwi1* and *PpiPiwi2*), two paralogues of Bruno (*PpiBruno* and *PpiBruno2*; expression data obtained only for *PpiBruno*) and one orthologue of PL10 (*PpiPL10*) (amino-acid sequences provided in Supplementary data Fig. S1). The trees establishing orthology relationships are provided as Supplementary data (Fig. S2-S4). The two ctenophore Piwi paralogues *PpiPiwi1* and *PpiPiwi2* are closely related and they clearly originated from a ctenophore-specific duplication.

### *Gene expression in the germline*

All genes investigated in this study are expressed in both the female and the male gonads (Fig. 1). In *Pleurobrachia pileus*, the male and female germlines are spatially segregated at both sides of each flattened meridional canal (Fig. 1A, B). We observed a strong expression of *PpiVasa*, *PpiPiwi1*, *PpiPiwi2*, *PpiBruno* and *PpiPL10* throughout the entire female gonad, in the oocytes at various stages of differentiation and in their surrounding nurse cells (Fig. 1C-H). Oocytes are recognisable by the small size of their nucleus (Martindale & Henry 1997) and by the presence in their cytoplasm of a central mass of vitellus, unstained in ISH preparations (red asterisk in Fig. 1C, 1E-H). The nurse cells belong to the same cell lineage as the oocyte, to which they remain connected via cytoplasmic bridges resulting from incomplete cytokinesis, and are thought to provide mRNAs and food storage to the oocyte (Dunlap, 1966; Dunlap-Pianka, 1974; Martindale & Henry 1997). In the male gonad, gene transcripts are restricted to the most external region (annotated spg in Fig. 1B and Fig. 1I-I') and are not detected in the mature sperm cells located in the internal-most region (spz in Fig. 1B and Fig. 1I-I'). This is obvious on a transverse cryosection of a gonad stained with *PpiVasa* anti-sense RNA probe and DAPI counterstaining (Fig. 1I-I'), where mature spermatozooids recognisable by their smaller nucleus and concentrated in the internal region are unstained. In conclusion, *PpiPiwi1* and *2*, *PpiVasa*, *PpiBruno* and *PpiPL10* are expressed in the germ cells of *Pleurobrachia pileus*, during oogenesis, and during spermatogenesis but not in mature sperm cells.

### *Gene expression in the stem cells of the tentacle root*

All genes investigated in this study except *PpiPiwi2* showed a similar expression pattern in the tentacle root, notably in the stem cells/undifferentiated progenitors of colloblasts and muscle cells. The internal side of tentacle roots stained with *PpiVasa*, *PpiPiwi1*, *PpiPL10* or *PpiBruno* anti-sense probes has the aspect of a coffee seed, with three longitudinal lines connected at the oral and aboral root poles (Fig. 2A-D, internal views). In transverse sections of tentacle roots after whole mount ISH (Fig. 2E-H), gene transcripts appear confined to the distal extremities (ridges) of three expansions located on the internal side of the root: two symmetrical lateral expansions and a median expansion. In the lateral expansions, staining decreases proximally as a brownish natural coloration appears within the cells (Fig. 2E-I). This brownish coloration is due to pigmented vesicles (P-granules) accumulating in the cytoplasm of colloblasts. DAPI staining reveals that mRNA positive cells possess a large round nucleus with well-developed nucleolus (Fig. 2I'). In the median expansion, staining is likewise restricted to the distal-most cells, with a round nucleolated nucleus, and is excluded from the most proximal cells which possess a smaller and elongated nucleus (Fig. 2J-J').

Previous histological investigations (Benwitz, 1978; Franc, 1985) have suggested that progenitors of mature tentacle cells locate at the edges of these three expansions. According to Benwitz (1978), stem cells and progenitors of colloblasts are the most abundant cell type in the distal part of the lateral expansions, and these cells differentiate as they migrate on the tentacle root external surface, towards the tentacle base. This “conveyor belt” mechanism accounts for the gradient of brownish pigmentation of colloblast cells visible on transverse sections. The median ridge contains stem cells/progenitors of the tentacle mesogleal cells, including muscle fibres (Franc, 1985). Our TEM observations confirm that the distal tips of the lateral expansions mostly contain ovoid cells with high nucleo-cytoplasmic ratio, one prominent nucleolus in the nucleus, highly condensed heterochromatin, and a cytoplasm poor in organelles (with only a few mitochondria) (Fig. 2L), in accordance with previous descriptions by Benwitz (1978). In the median ridge, TEM observation reveals cells with similar undifferentiated phenotypes but an elongated shape (Fig. 2M) as described for muscle cell progenitors (Franc, 1985). More data on the differentiation of tentacle muscle cells in the median expansion of the root are provided in Supplementary data, Fig. S5.

To better characterise cellular dynamics in the tentacle root, we performed EdU labelling of replicating nuclei. After a 30 min pulse, no EdU incorporation was detected (not shown). After a 12 hrs pulse of EdU incubation, labelled cells in the lateral expansions were distributed from the lateral ridge to the area where they begin to acquire brown colour (Fig. 3A-A'). After a 24 hrs chase, most of the staining was displaced towards a more proximal position, but a few distal cells with large nuclei retained EdU (Fig. 3B-B'). Following 5 day chase, long-term retention was seen in some of the large nuclei at the lateral ridge (Fig. 3C, C', detail in 3D), while most of the DNA-label had moved to differentiated colloblasts, towards the tentacle base (Fig. 3C, C', detail in 3D'). In the median expansion, after 12 hrs EdU pulse, much of the distal-most nuclei were labelled (Fig. 3E, pink arrowheads). Long-term label retention after 5 day chase was observed in some distal nuclei (Fig 3F, pink arrowheads), the vast majority of labelled nuclei being those of differentiating muscle cells (mu in Fig. 3F). Our interpretation of these results is illustrated in Fig. 3G.

In addition to these easily interpretable expression sites, the genes were also expressed in symmetrical cell populations called here the “aboral/external cell masses”, that have been previously shown to express some SOX genes (see Fig. 2G-K in Jager et al. 2008). These cells are located towards the aboral extremity of the tentacle root, on its external side (arrowheads in Fig 2A'-D'; detail in Fig. 2K) and are arranged in two symmetrical strands running from the aboral extremity of the root to the tentacle base (Fig. 2K, dotted line). In DAPI views (Fig. 2K') their nuclei are small and densely packed. Strong EdU incorporation after 12 hrs pulse (Fig 3H, aec) demonstrates that these cells actively divide. TEM sections show that these cells are often linked to each other by cytoplasmic bridges (Fig. 2N, yellow arrowheads), and possess a round nucleus and high nucleo-cytoplasmic ratio (Fig. 2N). These cells could be undifferentiated progenitors, but if this is true, their fate is unknown.

The *PpiPiwi2* gene has a totally different expression pattern in the tentacle root. This gene is not expressed along the three ridges. Transcripts were detected (i) in the aboral/external cell masses described previously (Fig. 2O, 2P, aec) and (ii) in a very restricted area towards the oral extremity (Fig. 2O, O', red arrowhead; Fig 2Q-S'). In transverse section towards the oral extremity of the tentacle root (Fig. 2Q), *PpiPiwi2* transcripts are distributed according to a D-

shaped pattern, comprising four areas which we labelled for clarity as follows: “1” for the most external zone, “2” for the most internal, and “3” for the lateral zones (Fig. 2Q). Cells located in the centre of the D-shaped area are not stained (Fig. 2Q). Zone “1” comprises small round nuclei in comparison to the non stained cells (Fig. 2R, R’) ; zone “2” comprises heterogeneous nuclei in term of size and shape (Fig. 2S, S’), and zone “3” contains small elongated nuclei (Fig. 2S, S’). There is also faint *PpiBruno* expression in zone 2 (Fig. 2G). The nature of these cells is unknown, but since they are located just beneath the youngest tentillae close to the production zone of tentillae (Fig. 2Ta), it is tempting to imagine that all or some of these *PpiPiwi2* stained cells could be progenitors of tentillar cells. Gene expression in the tentacle root is summarised in Fig. 2T.

#### *Expression in the stem cells/undifferentiated progenitors of the comb rows*

Within the comb rows, *PpiPiwi1*, *PpiVasa*, *PpiBruno* and *PpiPL10* are expressed in the forming combs and at both extremities of mature combs (Fig. 4), and these expression sites correspond to stem cells and/or progenitors of the polster cells, the ciliated cells of the combs. Forming combs, recognisable by their small size, could only be detected towards the oral and aboral extremities of comb rows, indicating that comb rows do not grow by intercalation of new combs all along the row, but by a kind of localised terminal growth (Fig. 4A-H, combs are numerated from the youngest to the oldest). The identification of comb anlagen is more straightforward at the oral extremity of each comb row, where there is clear and progressive decrease in comb length (Fig. 4A, D, G). *PpiPiwi1* (Fig. 4A-B), *PpiVasa* (Fig. 4D), *PpiPL10* (Supplementary data Fig. S6A) and *PpiBruno* (Supplementary data Fig. S6B) are expressed in all cells of the smallest recognisable oral baby combs. These cells possess a large, round and nucleolated nucleus (e.g., Fig. 4B’, at the oral extremity of a comb row). In slightly older combs, gene expression is excluded from a central zone where polster cells are thought to differentiate (see for example comb (iii) on Fig. 4A).

The mode of comb addition is clearly different at the aboral extremity of the comb rows. Here, there is no progressive decrease of comb width, the first aboral comb being mature and its length approaching that of less terminal combs. Our observation of many DAPI stained specimens revealed that aboral baby combs systematically localise between the first and

second (mature) aboral combs (Fig. 4H). Furthermore, we never found more than a single baby comb in this area. *PpiPiwi1* (Fig. 4C), *PpiVasa* (Fig 4E-F), *PpiPL10* (Supplementary data Fig. S6A') and *PpiBruno* (Supplementary data Fig. S6B') are all expressed in these aboral baby combs. In conclusion, the mode of comb addition is sub-terminal at the aboral comb row extremity whereas it is terminal at the oral extremity. This difference might reflect an architectural constraint, owing to the presence at the aboral comb row extremity of a ciliated groove which ensures electrical communication between the apical organ and the comb row (cg in Fig. 1A). This ciliated groove has no equivalent at the oral extremity.

Mature combs are mostly made of differentiated polster cells, which bear cilia. In such mature combs, transcripts are restricted to two crescent shape areas at both comb extremities (Fig. 4I-N'). DAPI staining reveals that positive cells possess a round and nucleolated nucleus, while the flanking polster cells have small elongated nuclei (for example see Fig 4N'). At the comb extremities, observation of semi-thin and TEM sections revealed cells with a typical undifferentiated phenotype: high nucleo-cytoplasmic ratio, large nucleus with well-developed nucleolus, and a reduced cytoplasm containing few organelles (Fig. 4O, P). Gene expression in the comb rows is summarised in Fig. 4Q.

In addition, these cells actively divide, give rise to polster cells and retain EdU in the long term (Fig. 5). After a short pulse of 30 min (not shown) or a long pulse of 12 hrs (Fig. 5A-A''), EdU is incorporated in many nuclei located at the comb extremities, but not in the polster cells. Interestingly, after a long pulse followed by a 24 hrs chase, a few polster cell nuclei (recognisable by their elongated shape) are labelled (Fig. 5B-B'', pink arrowheads), demonstrating that indeed polster cells belong to the progeny of the dividing cells located in the crescent-shape areas. Finally, these undifferentiated cells retain EdU after a 5 day chase (Fig. 5C-C'') strongly suggesting that they are stem cells. Some polster cell nuclei are also stained after 5 day chase (insert in Fig. 5C-C''). These data indicate that the combs grow by lateral addition of new polster cells.

*Gene expression labels restricted stem cell pools within the aboral sensory complex*

All investigated genes, except *PpiPiwi2*, are expressed in four patches of cells in the proximal region of the polar fields (Fig 6A-D'', G). DAPI counter-staining reveals relatively large nuclei in these areas (Fig. 6A''-D''). These patches visualised in a DAPI-treated specimen after fixation but no dehydration (for better preservation of structures) contain large densely packed nuclei (Fig. 6E-F) suggesting high nucleo-cytoplasmic ratio. After a 30 min or 12 hrs EdU pulse, several cell populations in the aboral region had positive nuclei, including cells in the marginal and central zones of the polar field, and epithelial cells surrounding the apical organ (especially with a 12 hrs pulse) (Fig. 7A-B''). Interestingly, after a 24 hrs chase, staining decreased except in the proximal part of the polar field central zone (Fig. 7C-C''). After a 5 day chase, long-term EdU retention was strictly restricted to four patches of densely packed nuclei (7D-D'') whose anatomical position was identical to the four spots of gene expression (Fig. 6A-D). Long-term retention of EdU by these cells together with their high nucleo-cytoplasmic ratio suggests that they are slowly-dividing nested cells, and thereby stem cells.

## **Discussion**

### *Divergent expression patterns for the two Piwi paralogues PpiPiwi1 and PpiPiwi2*

The two paralogues *PpiPiwi1* and *PpiPiwi2* clearly resulted from a duplication that took place in the ctenophore lineage (Supplementary data Fig. S2) and are highly similar in their amino-acid sequences (72% of sequence similarity), but their somatic expression patterns are strongly divergent. The expression territory of *PpiPiwi2* is much more reduced than that of *PpiPiwi1*, and the nature of the *PpiPiwi2*-expressing cells in the tentacle root is enigmatic. *PpiPiwi1* shares all its expression territories with *PpiVasa*, *PpiPL10* and *PpiBruno*, strongly evoking the situation observed in bilaterian classical models, where the homologues of these genes functionally interact, and in hydrozoans and planarians where they are expressed in similar cell types. Therefore, the four genes have probably been part of a same network at least since the common ancestor of eumetazoans. A corollary is that after duplication in the ctenophore lineage, *PpiPiwi1* retained the ancestral function, while *PpiPiwi2* somatic expression derived. Phylogenetic analysis of Piwi genes indicate that duplications have been relatively frequent during the evolutionary history of this family (see comment in Supplementary data, legend of Fig. S2).

### *Conserved expression of Piwi, Vasa, PL10 and Bruno in the germline*

Expression of Piwi and Vasa genes in the ctenophore germline adds to a vast array of data indicating that these genes were active in the germline of the common eumetazoan ancestor (Fig. 8) (and perhaps metazoans, but data are still scarce for sponges and absent for placozoans). Vasa has been found acting in the germline of all investigated animal species including vertebrates, ascidians, insects, planarians and cnidarians (Lasko and Ashburner, 1990; Castrillon et al, 2000; Mochizuki et al., 2001; Sunanaga et al., 2006, 2007; Pfister et al., 2008; Rosner et al., 2009). Piwi genes are expressed in both male and female germlines in

*Drosophila* (Cox et al., 2000; Lin and Spradling, 1997), planarians and acoels (De Mulder et al., 2009a, 2009b), the hydrozoan *Podocoryne* (Seipel et al., 2004), and are involved in spermatogenesis in mammals (Thomson and Lin, 2009). Piwi and Vasa are certainly part of a much wider gene network acting in the ancestral animal germline, to which belong the two additional genes investigated here, PL10 and Bruno, components of *Drosophila* germ plasm. PL10 is also expressed in the germline of the annelid *Platynereis* (Rebscher et al., 2007) and of the colonial ascidian *Botryllus* (Rosner et al., 2006) and PL10 and Bruno are both expressed in the planarian germline (Shibata et al., 1999; Guo et al., 2006).

In the *Pleurobrachia* male germline, the expression of *PpiVasa*, the two Piwi paralogues, *PpiPL10* and *PpiBruno* was switched off in mature spermatozoids (Fig. 1C-F, I). This seems to be a general tendency for “germline genes” across eumetazoans. In mouse, Piwi genes are expressed in sperm germ cells, spermatocytes and spermatids but not in mature sperm cells (Thomson & Lin, 2009), and planarian Piwi ceases expression in spermatozoids (De Mulder, et al. 2009b). Vasa and PL10 expression strongly decreases upon sperm cell maturation in *Botryllus* (Sunanaga et al. 2006) and likewise Vasa genes in planarian and hydra are downregulated in spermatozoids (Mochizuki et al., 2001; Pfister et al., 2008).

*PpiPiwi1, PpiVasa, PpiPL10 and PpiBruno are also expressed in the stem cells / undifferentiated progenitors of various somatic cell lineages*

Stem cells are generally defined by their capacity to self-renew while providing progenitors undergoing cell differentiation (Weissman et al., 2001; Gilbert, 2010). This fundamental property involves asymmetry within stem cell progeny, in the course of cell divisions. Yet practically, it is often difficult to unequivocally identify which are the stem cells within a given cell lineage, particularly with non-model organisms. Therefore, we used a combination of approaches to trace the presence of stem cells within the somatic expression territories of the investigated genes. The existence of a stem cell population at a given place might be considered convincing when (i) cytological investigation (using electron microscopy, DAPI

staining of nuclei...) indicates the presence of cells with undifferentiated phenotype; (ii) cell division (monitored here by EdU incorporation) occurs within this population of undifferentiated cells; (iii) the DNA label is retained within the nucleus of some of the undifferentiated cells after a long chase period. This last line of evidence is particularly important in support of the existence of slowly-dividing and self-renewing undifferentiated cells which stay indefinitely localised in their niche (see for instance Arai and Suda, 2008; Alunni et al., 2010). In addition, the identification of stem cell pools is greatly facilitated when the dynamic of cell lineage progression is reflected spatially in the form of gradients of cell differentiation, as for the colloblast and muscle cell lineages in the ctenophore tentacle root. However, we are aware of the limits of these approaches. Definitive demonstration of “stemness” would require individual tracing to prove that these proliferating cells remain undifferentiated and give rise to differentiated derivatives, but this is not currently possible with ctenophores due to a lack of convenient technical tools. Another limitation is that not all the cells of a stem cell population are label-retaining in a given labelling experiment.

With these limitations in mind, we could nevertheless convincingly show that in ctenophore, the Piwi, Vasa, Bruno and PL10 gene combination is consistently associated with stemness / undifferentiated state, irrespective of anatomical context and cell fate. Demonstration of gene co-expression at the individual cell level would require double *in situ* hybridisation, but these four genes have indistinguishable expression patterns, and at the anatomical level they clearly label the same cell populations with typical features of stem cells / undifferentiated progenitors. It is furthermore significant that these stem cell pools are totally heterocline in terms of the somatic cell types that are derived from them: ectodermal colloblasts vs. mesogleal muscle cells for the stem cells located respectively in the lateral ridges and the median ridge of the tentacle root; epithelial ciliated “polster cells” for the stem cells located at the comb extremity; putative neural and/or sensory cells of the aboral sensory complex for the four patches of stem cells around the apical organ.

### *Implications concerning the early evolution of stem cells*

Piwi and Vasa are widely known among developmental biologists as germline markers, and it is only recently that their functions beyond the germline have begun to attract attention. Data gathered from the literature concerning the expression in various metazoan taxa of Piwi, Vasa, PL10 and Bruno (in the germline / in multipotent stem cells that generate somatic and germ cells / in stem cells giving rise to somatic cells only), together with ctenophore data from this study, are summarised in Fig. 8. In many of the emerging bilaterian models (colonial urochordates, echinoderms, planarians, annelids and acoels), these genes are not restricted to the germline but are expressed in multipotent stem cells. Yet these cells are known or thought to produce germ cells, often leading authors to maintain the idea of a link between these genes (particularly Vasa) and germ cell determination. For example, Rebscher et al. (2007) proposed a model in which Vasa, Piwi and PL10 ancestrally carried out a first step in germline determination by specifying a multipotent population of stem cells within which primordial germ cells (PGCs) are sorted out later.

Our expression analyses of Piwi, Vasa, Bruno and PL10 in a member of the early-branching eumetazoan phylum Ctenophora show expression of these genes in germ cells, but also in various localised populations of adult stem cells confined to somatic tissues and having nothing to do with the germline. This suggests a different view: that ancestrally in eumetazoans, this gene combination would be linked to the germline on one hand, and to stemness on the other hand, and that these two contexts must be considered separately. Admittedly, there is no experimental proof that ctenophore somatic stem cells are incapable of producing germ stem cells, but under normal conditions this seems highly unlikely. The endodermal gonads have their own stocks of germ stem cells (not shown long-term EdU retention results) and are spatially distant from the structures where we identified the somatic stem cell pools. Furthermore, young ctenophore “half-individuals” obtained after sectioning of early embryos consistently produce gametes in only two of their four gonads, implying that the two remaining gonads are not colonised by germ stem cells coming from elsewhere (Chun, 1880, 1892; Martindale, 1987).

Data from other animal groups fuel our hypothesis that the *Piwi* and *Vasa* genes were ancestrally associated with stemness. In hydra, PL10 and *Vasa* genes are expressed in interstitial cells i.e. multipotent cells that give rise to germ cells and to several types of somatic cells (Mochizuki et al., 2001). In addition, they are expressed in ectodermal epithelial cells (Mochizuki et al., 2001), considered to be stem cells (Bosch, 2009; Bosch et al., 2010) and having no germ cell in their progeny. In the *Clytia hemisphaerica* hydromedusa, *Piwi*, *Vasa* and PL10 are expressed in somatic stem cells at the base of the tentacle bulb, giving rise to tentacle nematocytes (Denker et al., 2008 for *Piwi*; Leclère, 2008 for *Vasa* and PL10). There are also instances of *Piwi* expression in strictly somatic stem cells in bilaterians (e.g. *MILI* expression in adult mouse mesenchymal stem cells; Wu et al., 2010) (see Fig. 8). Total (for *Vasa*) or partial (for *Piwi* and PL10) restriction of these genes to the germline in some bilaterian groups (e.g. vertebrates and insects) is certainly a derived condition acquired secondarily in these lineages. An important practical consequence is that it is not appropriate to use these genes, including *Vasa*, as germline or PGC markers in exploratory studies of non-model organisms including bilaterian species outside from these particular lineages (see for instance Rosner et al., 2009).

#### *The ctenophores, a non-bilaterian animal phylum with spatially segregated adult cell renewal systems*

Non-bilaterian phyla are commonly viewed as animals with a low level of anatomical complexity. In contrast, recent genomic analyses have highlighted their genetic complexity (Miller et al., 2005; Putnam et al., 2007; Srivastava et al., 2008). Ctenophores, despite being one of the early-branching metazoan phyla, provide a spectacular example of a significant increase in organism complexity, independently from the bilaterian clade. The present study highlights a notable aspect of this body complexity, i.e. the existence in adult ctenophores of a variety of spatially restricted cell renewal systems, each comprising its own pool of somatic stem cells. Except for those of the tentacle root, the stem cells pools identified in the present study had not been described before, although they had been suspected based on the

expression of two SOX family genes (*PpiSOX2* and *PpiSOX12*; Jager et al., 2008). The ctenophore data challenges the common view that ancestral animal stem cells were totipotent/multipotent and more or less scattered throughout the body (like for sponge archaeocytes, hydrozoan interstitial cells and planarian neoblasts) (Müller, 2006; Agata et al., 2006, Funayama, 2010; or hydra, Bosch et al., 2010), by suggesting that spatial restriction and lineage-specificity of adult stem cells might have arisen earlier during animal evolution than usually thought.

The tentacle root is a promising experimental system to investigate stem cell regulation, cell specification and cell differentiation in ctenophores. Ordered differentiation of colloblasts along a “conveyor belt” is somewhat analogous to ordered differentiation of nematoblasts along the tentacle bulb axis in the *Clytia hemisphaerica* medusa (Denker et al., 2008; Houlston et al., 2010). The tentacle root system could notably be suitable for addressing the role of niches in the control of stem cell proliferation and maintenance. For example, in the lateral ridges, colloblast stem cells lie in close contact and might interact with two differentiated cell types, cask cells (kappenzellen) and wall cells (deckzellen) (Benwitz, 1978). A possible path to tackle these issues would be to investigate the major signalling pathways that in bilaterians are involved in communications between stem cells and their niches. In the short term, to achieve a better understanding of the tentacle root, we need to characterise how tentillae are produced and how colloblasts are respectively addressed to the tentacle axis or to the tentillae. Another intriguing enigma to be solved is neurogenesis in the tentacle root. Tentacle and tentillae each have nerve cords localised in their axial mesoglea, but where these nerve cells form is unknown.

## Conclusions

In the ctenophore *Pleurobrachia pileus*, Piwi, Vasa, Bruno and PL10 are expressed in the germline and in spatially restricted pools of somatic stem cells. Although we cannot completely rule out that this situation is secondarily derived in ctenophores, comparison with

data from other lineages suggest that association of the so-called “germline genes” with stemness has been inherited from a eumetazoan common ancestor.

Recently, there have been fruitful examples of the search for common molecular signatures of cell types among distantly related taxa, to identify homologies at the cellular level and reconstruct ancestral features of the major cell types. This approach works well with clear-cut differentiated cell types that express well-identified orthologous marker genes, either regulatory or structural (e.g. photoreceptor cells, Arendt et al., 2004; Arendt, 2008). However, this strategy is in principle much more difficult to apply to stem cells, because the notion of stemness encompasses by default characteristics (undifferentiated state), characteristics shared with non-stem cells (capacity of cell division) and processes that can be achieved through a variety of molecular mechanisms (asymmetry of cell fate within the progeny). Given this impalpable nature of stemness, it can seem surprising that a combination of genes tightly associated with the germline in conventional developmental models turns out to be proposed as an ancestral molecular signature of stemness. The fundamental reason why these genes are ancestrally linked to stemness (in addition to the germline) has probably to do with the main function of the Piwi-piRNA pathway, i.e. genome protection through transposon silencing (Vagin et al., 2006; Aravin et al., 2007; Thomson and Lin, 2009; Tang, 2010; Siomi et al., 2010).

Genome protection is a crucial requirement not only for germ cells (because they can potentially transmit their genome to the next generation), but also for somatic stem cells, devoted all life long to the production of progenitors for proper tissue renewal. It is therefore significant that expression of Piwi and functionally related genes in the germline is not restricted to germ stem cells but generally persists in differentiating gametes, whereas in somatic territories they are generally not expressed beyond stem cells and progenitors (differentiated cells do not transmit their genome). Furthermore, a corollary is that ancestral involvement of this series of genes in both the germline (including germ stem cells) and somatic stem cells does not particularly imply their “common origin” in a genealogical sense, but the requirement of the same transposon silencing pathway in two different contexts. Data

on the expression, function and interactions of these genes and other “germline genes” (like Tudor, nanos, pumilio etc.) in a representative sampling of early-branching metazoans (e.g. sponges, placozoans, anthozoans and scyphozoans, ctenophores) will be crucial for testing these hypotheses and, ultimately, for reconstructing the molecular fingerprint of the ancestral metazoan stem cells.

## **Acknowledgements**

We thank the directors and staff of the Station Zoologique in Villefranche-sur-Mer and of the Station Biologique de Roscoff for welcoming us. We thank Evelyn Houlston for providing lab facilities and the sailors of the Villefranche zoological station and Roscoff biological station for their help for animal collection. We thank Sophie Pagnotta and the Centre Commun de Microscopie Appliquée (CCMA), Université de Nice Sophia Antipolis, for access to their Transmission Electronic Microscope, and the Bruce Shilito group for giving us the opportunity to use their Ultra Microtome. We are very grateful to Lydie Morel and Etienne Herzog (INSERM UMRS 952, Université Pierre et Marie Curie) for teaching us the cryosection technique and for advice, and to Pierrette Lamarre for technical help. We are particularly grateful to Sylvie Rétaux, Nicolas Rabet, Evelyn Houlston, Jean-Michel Hermel, Nicolas Vidal and Carole Borchiellini for stimulating scientific discussion and useful technical advice. EST sequencing was performed by the Consortium National de Recherche en Génomique at the Genoscope (Evry, France). This work was supported by a grant from the GIS “Institut de la Génomique Marine” – ANR “programme blanc” NT\_NV\_52 Genocnidaire and by the “Agence Nationale de la Recherche” grant ANR-09-BLAN-0236-01 DiploDevo.

## **Appendix A. Supplementary data**

Supplementary data associated with this article includes the sequence alignments and 6 supplementary figures and can be found, in the online version, at...

## References

- Abdelhaleem, M., 2005. RNA helicases: regulators of differentiation. *Clin. Bioch.* 38, 499-503.
- Agata, K., Nakajima, E., Funayama, N., Shibata, N., Saito, Y., Umesono, Y., 2006. Two different evolutionary origins of stem cell systems and their molecular basis. *Sem. Cell Dev. Biol.* 17, 503-509.
- Alunni, A., Hermel, J.M., Heuzé, A., Bourrat, F., Jamen, F., Joly, J.-S., 2010. Evidence for neural stem cells in the medaka optic tectum proliferation zones. *Dev. Neurobiol.* 70(10), 693-713.
- Arai, F. and Suda, T., 2008. Quiescent stem cells in the niche (July 11, 2008), StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, doi/10.3824/stembook.1.6.1, <http://www.stembook.org>
- Aravin, A.A., Hannon, G.J., Brennecke, J., 2007. The Piwi-piRNA Pathway Provides an Adaptive Defense in the Transposon Arms Race. *Science* 318, 761-764.
- Arendt, D., 2008. The evolution of cell types in animals: emerging principles from molecular studies. *Nat. Rev. Genet.* 9, 868-82.
- Arendt, D., Tessmar-Raible, K., Snyman, H., Dorresteijn, A.W., Wittbrodt, J., 2004. Ciliary Photoreceptors with a Vertebrate-Type Opsin in an Invertebrate Brain. *Science* 306, 869-871.
- Benwitz, G., 1978. Elektronenmikroskopische Untersuchung der Colloblasten-Entwicklung bei der Ctenophore Pleurobrachia pileus (Tentaculifera, Cydippea). *Zoomorphologie* 89,257-278.
- Bosch, T.C., 2009. Hydra and the evolution of stem cells. *Bioessays* 31(4), 478-486.
- Bosch, T.C.G., Anton-Erxleben, F., Hemmrich, G., Khalturin, K., 2010. The Hydra polyp: nothing but an active stem cell community. *Dev. Growth Differ* 52, 15-25.
- Brown, F.D., Keeling, E.L., Le, A.D., Swalla, B.J., 2009. Whole body regeneration in a colonial ascidian, *Botrylloides violaceus*. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 312(8), 885-900.
- Brusca, R.C., Brusca, G.J., 2003. Invertebrates, second ed. Sinauer, Sunderland, MA.
- Castrillon, D.H., Quade, B.J., Wang, T.Y., Quigley, C., Crum, C.P., 2000. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9585-9590.
- Chehrehasa, F., Meedeniya, A.C., Dwyer, P., Abrahamsen, G., Mackay-Sim, A., 2009. EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. *J. Neurosci. Methods*. 177, 122-130.
- Chun, C., 1880. Die Ctenophoren des Golfes von Neapel und der angrenzenden Meeres-Abschnitte: eine Monographie, Verlag von W. Engelmann, Leipzig.
- Chun, C., 1892. Die Dissogonie, eine neue Form der geschlechtlichen Zeugung, Festsch. Zum siebenzigsten Geburtstage Rudolf Leuckarts, Leipzig, pp. 77-108.
- Cox, D., Chao, A., Lin, H., 2000. piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development* 127, 503-514.
- De Mulder, K., Kuales, G., Pfister, D., Willems, M., Egger, B., Salvenmoser, W., Thaler, M., Gorny, AK., Hrouda, M., Borgonie, G., Ladurner, P., 2009a. Characterization of the stem cell system of the acoel *Isodiametra pulchra*. *BMC Dev Biol* 9, 69.

- De Mulder, K., Pfister, D., Kuales, G., Egger, B., Salvenmoser, W., Willems, M., Steger, J., Fauster, K., Micura, R., Borgonie, G., Ladurner, P., 2009b. Stem cells are differentially regulated during development, regeneration and homeostasis in flatworms. *Dev. Biol.* 334, 198-212.
- Denker, E., Manuel, M., Leclère, L., Le Guyader, H., Rabet, N., 2008. Ordered progression of nematogenesis from stem cells through differentiation stages in the tentacle bulb of *Clytia hemisphaerica* (Hydrozoa, Cnidaria). *Dev. Biol.* 315, 99-113.
- Derelle, R., Manuel, M., 2007. Ancient connection between NKL genes and the mesoderm? Insights from Tlx expression in a ctenophore. *Dev Genes Evol* 217, 253-61.
- Dunlap, H.L., 1966. Oogenesis in the Ctenophora. Ph.D. Thesis, University of Washington, Seattle, Washington.
- Dunlap-Pianca, H., 1974. Ctenophora, in: Giese, A.C., Pearse, J.S. (Eds), Reproduction of marine invertebrates, Vol. 1, Acoelomate and pseudocoelomate metazoans. Academic Press, New-York, pp. 281-304.
- Dunn, C.V., Hejnol, A., Matus, D.Q., Pang, K., Browne, W.E., Smith, S.A., Seaver, E., Rouse, G.W., Obst, M., Edgecombe, G.D., Sørensen, M.V., Haddock, S.H.D., Schmidt-Rhaesa, A., Okusu, A., Kristensen, R.M., Wheeler, W.C., Martindale, M.Q., Giribet, G., 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452, 745-9.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32, 1792-1797.
- Eisenman, E.A., and Alfert M., 1981. A new fixation procedure for preserving the ultrastructure of marine invertebrate tissues. *J. Microscopy* V 125, 117-120.
- Fleming, H.E., Janzen, V., Lo Celso, C., Guo, J., Leahy, K.M., Kronenberg, H.M., Scadden, D.T., 2008. Wnt Signaling in the Niche Enforces Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Is Necessary to Preserve Self-Renewal In Vivo. *Cell Stem Cell* 2, 274-283.
- Foresta, C., Ferlin, A., Moro, E., 2000. Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum. Mol. Genet.* 9(8), 1161-1169.
- Franc, J.M., 1985. La mésoglée des cténaires: Approches ultrastructurale, biochimique et métabolique, Université Claude Bernard - Lyon I, Lyon.
- Funayama, N., 2010. The stem cell system in demosponges: insights into the origin of somatic stem cells. *Develop. Growth Differ.* 52, 1-14.
- Funayama, N., Nakatsukasa, M., Mohri, K., Masuda, Y., Agata, K., 2010. Piwi expression in archeocytes and choanocytes in demosponges: insights into the stem cell system in demosponges. *Evol. Dev.* 12, 275-287.
- Gilbert, S.F., 2010. Developmental Biology, ninth ed. Sinauer, Sunderland MA.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696-704.
- Guo, T., Peters, A.H.F.M., Newmark, P.A., 2006. A Bruno-like gene is required for stem cell maintenance in planarians. *Dev. Cell* 11, 159-169.
- Gustafson, E.A., Wessel, G.M., 2010. Vasa genes: Emerging roles in the germ line and in multipotent cells. *BioEssays* 32, 626-637.
- Hejnol A, Obst M, Stamatakis A, Ott M, Rouse GW, Edgecombe GD, Martinez P, Baguñà J, Bailly X, Jondelius U, Wiens M, Müller WEG, Seaver E, Wheeler WC, Martindale MQ, Giribet G, Dunn CW., 2009. Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proc R Soc Lond B. Biol. Sci.* 276, 4261-4270.

- Hemmrich, G., Bosch, T.C., 2008. Compagen, a comparative genomics platform for early branching metazoan animals, reveals early origins of genes regulating stem-cell differentiation. *BioEssays* 30, 1010-1018.
- Hernandez-Nicaise, M.-L., 1991. Ctenophora, in: Harrison, F.W., Westfall, J.A. (Eds), *Microscopic Anatomy of the Invertebrates. Volume II: Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora*. John Wiley, New York, pp. 359-418.
- Hertwig, R., 1880. Ueber den Bau der Ctenophoren. *Jenaische Z. Naturwiss.* 14, 313-457.
- Houliston, E., Momose, T., Manuel, M., 2010. *Clytia hemisphaerica*: a jellyfish cousin joins the laboratory. *Trends Genet.* 26, 159-167.
- Houwing, S., Kamminga, L.M., Berezikov, E., Cronembold, D., Girard, A., van den Elst, H., Filippov, D.V., Blaser, H., Raz, E., Moens, C.B., Plasterk, R.H., Hannon, G.J., Draper, B.W., Ketting, R.F., 2007. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in zebrafish. *Cell* 129(1), 69-82.
- Ikenishi, K., Tanaka, T.S., 2000. Spatio-temporal expression of Xenopus vasa homolog, SVLG1, in oocytes and embryos: the presence of XVLG1 RNA in somatic cells as well as germline cells. *Dev. Growth Differ.* 42(2), 95-103.
- Ivanova, N.B., Dimos, J.T., Schaniel, C., Hackney, J.A., Moore, K.A., Lemischka, I.R., 2002. A Stem Cell Molecular Signature. *Science* 298, 601-604.
- Jager, M., Quéinnec, E., Chiori, R., Le Guyader, H., Manuel, M., 2008. Insights into the early evolution of SOX genes from expression analyses in a ctenophore. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol* 310, 650-667.
- Jager, M., Chiori, R., Alié, A., Dayraud, C., Quéinnec, E., Manuel, M., 2010. New insights on ctenophore neural anatomy: immunofluorescence study in *Pleurobrachia pileus* (Müller, 1776). *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* In press.
- Johnstone, O., Deuring, R., Bock, R., Linder, P., Fuller, M.T., Lasko, P., 2005. Belle is a *Drosophila* DEAD-box protein required for viability and in the germ line. *Developmental Biology* 277, 92-101.
- Juliano, C.E., Voronina, E., Stack, C., Aldrich, M., Cameron, A.R., Wessel, G.M., 2006. Germ line determinants are not localized early in sea urchin development, but do accumulate in the small micromere lineage. *Dev. Biol.* 300(1), 406-415.
- Juliano, C.E., Wessel, G.M., 2009. An evolutionary transition of Vasa regulation in echinoderms. *Evol. Dev.* 11(5), 560-573.
- Khalturin, K., Anton-Erxleben, F., Milde, S., Plötz, C., Wittlieb, J., Hemmrich, G., Bosch, T.C.G., 2007. Transgenic stem cells in *Hydra* reveal an early evolutionary origin for key elements controlling self-renewal and differentiation. *Dev. Biol.* 309, 32-44.
- Krovel, A.V., Olsen, L.C., 2002. Expression of a vas::EGFP transgene in primordial germ cells of the zebrafish. *Mech. Dev.* 116(1-2), 141-150.
- Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Yomogida, K., Kuroiwa, A., Tadokoro, Y., Fujita, Y., Sato, M., Matsuda, Y., Nakano, T., 2001. Two mouse piwi-related genes: miwi and mili. *Mech. Dev.* 108(1-2), 121-133.
- Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Takamatsu, K., Chuma, S., Kojima-Kita, K., Shiromoto, Y., Asada, N., Toyoda, A., Fujiyama, A., Totoki, Y., Shibata, T., Kimura, T., Nakatsujii, N., Noce, T., Sasaki, H., Nakano, T., 2010. MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons. *Genes Dev.* 24(9), 887-892.
- Lasko, P.F., Ashburner, M., 1990. Posterior localization of vasa protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development. *Genes & Development* 4, 905-921.

- Lau, N.C., Ohsumi, T., Borowsky, M., Kingston, R.E., Blower, M.D., 2009. Systematic and single cell analysis of *Xenopus* Piwi-interacting RNAs and Xiwi. *EMBO J.* 28(19), 2945-2958.
- Leclère, L. 2008. Evolution de la reproduction sexuée des hydrozoaires: aspects historiques, analyse phylogénétique développementale. Thèse de l'Université Pierre Marie Curie, Paris.
- Lin, H., Spradling, A., 1997. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary . *Development* 124, 2463 -2476 .
- Liu, N., Han, H., Lasko, P., 2009. Vasa promotes *Drosophila* germline stem cell differentiation by activating mei-P26 translation by directly interacting with a (U)-rich motif in its 3' UTR. *Genes & Development* 23, 2742-2752.
- Martindale, M.Q., 1987. Larval reproduction in the ctenophore, *Mnemiopsis mycrradyi* (order Lobata). *Mar. Biol.* 94, 409-414.
- Martindale, M.Q., Henry, J., 1997. Ctenophorans, the comb jellies, in: Gilbert, S.F., Raunio, A.M. (Eds), *Embryology: constructing the organism*. Sinauer, Sunderland, MA, pp. 87-111.
- Miller, D.J., Ball, E.E., Technau, U., 2005. Cnidarians and ancestral genetic complexity in the animal kingdom. *Trends in Genetics* 21, 536-539.
- Mochizuki, K., Nishimiya-Fujisawa, C., Fujisawa, T., 2001. Universal occurrence of the vasa-related genes among metazoans and their germline expression in *Hydra*. *Dev. Genes Evol* 211, 299-308.
- Müller, W.E.G., 2006. The stem cell concept in sponges (Porifera): metazoan traits. *Sem. Cell Dev. Biol.* 17, 481-491.
- Pfister, D., De Mulder, K., Hartenstein, V., Kuales, G., Borgonie, G., Marx, F., Morris, J., Ladurner, P., 2008. Flatworm stem cells and the germ line: developmental and evolutionary implications of macvasa expression in *Macrostomum lignano*. *Dev. Biol* 319, 146-159.
- Philippe, H., Derelle, R., Lopez, P., Pick, K., Borchiellini, C., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Renard, E., Houliston, E., Quéinnec, E., Da Silva, C., Wincker, P., Le Guyader, H., Leys, S., Jackson, D.J., Schreiber, F., Erpenbeck, D., Morgenstern, B., Wörheide, G., Manuel, M., 2009. Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships. *Curr. Biol.* 19, 706–712.
- Pick, K.S., Philippe, H., Schreiber, F., Erpenbeck, D., Jackson, D.J., Wrede, P., Wiens, M., Alié, A., Morgenstern, B., Manuel, M., Wörheide, G., 2010. Improved phylogenomic taxon sampling noticeably affects non-bilaterian relationships. *Mol Biol Evol* 27(9), 1983-1987.
- Putnam, N.H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., Salamov, I.A., Terry, A., Shapiro, H., Lindquist, E., Kapitonov, V.V., Jurka, J., Genikhovich, G., Grigoriev, I.V., Lucas, S.M., Steele, R.E., Finnerty, J.R., Technau, U., Martindale, M.Q., Rokhsar, D.S., 2007. Sea Anemone Genome Reveals Ancestral Eumetazoan Gene Repertoire and Genomic Organization. *Science* 317, 86-94.
- Ramalho-Santos, M., Yoon, S., Matsuzaki, Y., Mulligan, R.C., Melton, D.A., 2002. "Stemness": Transcriptional Profiling of Embryonic and Adult Stem Cells. *Science* 298, 597-600.
- Raz, E. 2000. The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development. *Genome Biol* 1(3).
- Rebscher, N., Zelada-González, F., Banisch, T., Raible, F., Arendt, D., 2007. Vasa unveils a common origin of germ cells and of somatic stem cells from the posterior growth zone in the polychaete *Platynereis dumerilii*. *Dev. Biol.* 306, 599-611.
- Rebscher, N., Volk, C., Teo, R., Plickert, G., 2008. The germ plasm component vasa allows tracing of the interstitial stem cells in the cnidarian *Hydractinia echinata*. *Dev. Dyn.* 237, 1736-1745.

- Reddien, P.W., Oviedo, N.J., Jennings, J.R., Jenkin, J.C., Sanchez Alvarado, A., 2005. SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science* 310, 1327-1330.
- Rosner, A., Paz, G., Rinkevich, B., 2006. Divergent roles of the DEAD-box protein BS-PL10, the urochordate homologue of human DDX3 and DDX3Y proteins, in colony astogeny and ontogeny. *Dev. Dyn.* 235, 1508-1521.
- Rosner, A., Moiseeva, E., Rinkevich, Y., Lapidot, Z., Rinkevich, B., 2009. Vasa and the germ line lineage in a colonial urochordate. *Dev. Biol.* 331(2), 113-128.
- Seipel, K., Yanze, N., Schmid, V. (2004). The germ line and somatic stem cell gene Cniwi in the jellyfish *Podocoryne carnea*. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 1-7.
- Sharma, A.K., Nelson, M.C., Brandt, J.E., Wessman, M., Mahmud, N., Weller, K.P., Hoffman, R., 2001. Human CD34(+) stem cells express the hiwi gene, a human homologue of the *Drosophila* gene piwi. *Blood* 97(2), 426-434.
- Shibata, N., Umesono, Y., Orii, H., Sakurai, T., Watanabe, K., Agata, K., 1999. Expression of vasa(vas)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians. *Dev. Biol.* 206, 73-87.
- Siomi, M.C., Miyoshi, T., Siomi, H., 2010. piRNA-mediated silencing in *Drosophila* germlines. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, In Press.
- Srivastava, M., Begovic, E., Chapman, J., Putnam, N.H., Hellsten, U., Kawashima, T., Kuo, A., Mitros, T., Salamov, A., Carpenter, M.L., Signorovitch, A.Y., Moreno, M.A., Kamm, K., Grimwood, J., Schmutz, J., Shapiro, H., Grigoriev, I.V., Buss, L.W., Schierwater, B., Dellaporta, S.L., Rokhsar, D.S., 2008. The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans. *Nature* 454, 955-960.
- Snee, M., Benz, D., Jen, J., Macdonald, P.M., 2008. Two distinct domains of Bruno bind specifically to the oskar mRNA. *RNA Biol.* 5(1), 1-9.
- Spike, C., Meyer, N., Racen, E., Orsborn, A., Kirchner, J., Kuznicki, K., Yee, C., Bennett, K., Strome, S., 2008. Genetic analysis of the *Caenorhabditis elegans* GLH family of P-granule proteins. *Genetics* 178(4), 1973-1987.
- Sun, M.G., Williams, J., Munoz-Pinedo, C., Perkins, G.A., Brown, J.M., Ellisman, M.H., Green, D.R., Frey, T.G., 2007. Correlated three-dimensional light and electron microscopy reveals transformation of mitochondria during apoptosis. *Nat Cell Biol* 9, 1057-1065.
- Sunanaga, T., Saito, Y., Kawamura, K., 2006. Postembryonic epigenesist of *Vasa*-positive germ cells from aggregated hemoblasts in the colonial ascidian, *Botryllus primigenus*. *Develop. Growth Differ.* 48, 87-100.
- Sunanaga, T., Watanabe, A., Kawamura, K., 2007. Involvement of vasa homolog in germline recruitment from coelomic stem cells in budding tunicates. *Dev. Genes Evol.* 217, 1-11.
- Tang, F., 2010. Small RNAs in mammalian germline: Tiny for immortal. *Differentiation* 79, 141-146.
- Thomson, T., Lin, H., 2009. The Biogenesis and Function PIWI Proteins and piRNAs: Progress and Prospect. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25, 355-376.
- Vagin, V.V., Klenov, M.S., Kalmikova, A.I., Stolyanrenko, A.D., Kotelnikov, R.N., Gvozdev, V.A., 2004. The RNA Interference Proteins and Vasa Locus are Involved in the same Silencing of Retrotransposon in the Female Germline of *Drosophila melanogaster*. *RNA Biol.* 1, 54-58
- Vagin, V.V., Sigova, A., Li, C., Seitz, H., Gvozdev, V., Zamore, P.D., 2006. A Distinct Small RNA Pathway Silences Selfish Genetic Elements in the Germline. *Science* 313, 320-324.

- Vong, Q.P., Li, Y., Lau, Y.-F.C., Dym, M., Rennert, O.M., Chan, W.-Y., 2006. Structural characterization and expression studies of *Dby* and its homologs in the mouse. *J. Androl.* 27(5), 653-661.
- Webster, P.J., Liang, L., Berg, C.A., Lasko, P., Macdonald, P.M., 1997. Translational repressor bruno plays multiple roles in development and is widely conserved. *Genes Dev* 11, 2510-2521.
- Weissman, I., Anderson, D., Gage, F., 2001. Stem and progenitor cells: Origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17, 387-403.
- Wu, Q., Ma, Q., Shehadeh, L.A., Wilson, A., Xia, L., Yu, H., Webster, K.A., 2010. Expression of the Argonaute protein PiwiL2 and piRNAs in adult mouse mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396(4), 915-920.
- Yin, H., Lin, H., 2007. An epigenetic activation role of Piwi and a Piwi-associated piRNA in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 450, 304-U16.

## Figure legends

**Fig. 1.** Expression of *PpiVasa*, *PpiPiwi1*, *PpiPiwi2*, *PpiBruno* and *PpiPL10* in the gonads. (A) Diagram summarising the anatomy of *Pleurobrachia pileus*. The gonads are located by pairs (male in red, female in orange) in the walls of the meridional canals. abc: aboral baby comb; cb: comb; cg: ciliated groove; i: infundibulum; mo: mouth; oa: apical organ; obc: oral baby comb; pf: polar fields; te: tentacle; tei: tentillae; tr: tentacle root. (B) Transverse semi-thin section through a meridional canal, showing the male and female gonads. (C-G) Expression of *PpiVasa* (C), *PpiPiwi1* (D), *PpiPiwi2* (E), *PpiBruno* (F) and *PpiPL10* (G) in the gonads (male on the left, female on the right). (H). Detailed view of an oocyte surrounded by its nurse cells (nc), both expressing *PpiVasa*. The red star in (C-H) indicates the vitellus mass in the centre of oocyte cytoplasm. (H') DAPI counter-staining of (H), showing the small nucleus of the oocyte (arrow), contrasting with the large size of surrounding nurse cell nuclei. (I) Transverse cryosection of a meridional canal after *PpiVasa* whole mount ISH (male gonad on the left, female on the right). (I') DAPI counter-staining of (I). ec: ectoderm; lu: lumen of the meridional canal; m :mesoglea; nc: nurse cell; oo: oocytes; spg: spermatogenesis stages; spz: spermatozooids. Scale bars: B: 100 µm; C-H': 25 µm; I, I': 50 µm.

**Fig. 2.** Expression of *PpiPiwi1*, *PpiVasa*, *PpiBruno* and *PpiPL10* in the tentacle root. (A-D) Internal views of dissected tentacle roots stained with *PpiVasa* (A), *PpiPiwi1* (B), *PpiBruno* (C) and *PpiPL10* (D) anti-sense probes. (A'-D') External views of the tentacle roots shown in (A-D). White arrowheads: gene expression in the aboral/external cell masses showed at higher magnification in (K) for *PpiPiwi1* (see text). Aboral pole is on top for all tentacle root pictures. (E-H) Transverse cryosection of whole-mount ISH for the four genes, according to the plane shown in (A,A'). Red arrows in (E) indicate the sense of differentiation of the colloblasts (curved arrows) and muscle cells (straight arrow). (I) Detail of the expression of *PpiVasa* in the distal region (ridge) of a lateral expansion in transverse cryosection of whole-mount ISH. (I') DAPI counter-staining of (I). Insert: higher magnification of a nucleus from the Vasa-positive region (box); note the presence of a central nucleolus. (J) Expression of *PpiVasa* in the distal region (ridge) of the central expansion, on transverse cryosection of whole-mount ISH. (J') DAPI counter-staining of (J). (K) Higher magnification of the region boxed in (B') showing *PpiPiwi1* expression in the aboral/external cell population. (K') DAPI

counter-staining of (K). (L) TEM view of a putative colloblast stem cell, localised in the distal ridge of a lateral expansion. (M) TEM section through a median ridge, showing muscle cell progenitors. (N) TEM view of the aboral/external cell population. Yellow arrowheads point to cytoplasmic connections between the cells. (O-O') Internal (O) and external (O') views of a dissected tentacle root stained with *PpiPiwi2* anti-sense probe. Green arrowhead: *PpiPiwi2* expression in the aboral/external cell populations. Red arrowhead: oral site of *PpiPiwi2* expression. (P) Transverse cryosection at the aboral level (green plane in (O-O')) of a tentacle root after *PpiPiwi2* whole-mount ISH. Insert: DAPI counter-staining of the boxed area. (Q) Transverse cryosection at the oral level (red plane in (O-O')) of a tentacle root after *PpiPiwi2* whole-mount ISH. Note the D-shaped aspect of the expression pattern. (R) Higher magnification of the area boxed with a full line in (Q). (R') DAPI counter-staining of (R). (S) Higher magnification of the area boxed with a dotted line in (Q). (S') DAPI counter-staining of (S). In (Q-S), numbers indicate the three distinct zones of *PpiPiwi2* expression. (T) Diagram summarising gene expression patterns in the tentacle root. (a) external view of the tentacle root, (b) general view, (c) internal view of the tentacle root. aec: aboral/external cell masses; co: mature colloblasts; lr: lateral ridge; en: endodermal canal; EXT: external side; INT: internal side; mi: mitochondria; mu: muscle fibres; mr: median ridge; n: nucleus; nu: nucleolus; ten: tentacle. Scale bars: A,A',C,C',D,D',K,K',O: 100 µm; B,B': 200 µm; E-H,Q: 50 µm; I-J',P: 25 µm; L, M: 2 µm; N: 1 µm; R-S': 20 µm; insert in P: 25 µm.

**Fig. 3.** Results of EdU incorporation experiments in the tentacle root. (A-A') EdU incorporation after a 12 hrs pulse and no chase, in a dissected portion of the lateral expansion (see green box in (G)). The dotted line on the left materialises the edge of the lateral ridge. (A) DIC view showing the gradient of brown pigmentation in differentiating colloblasts. (A') Combination of EdU (green) and DAPI (red) fluorescence on the same preparation as in (A). The pink arrowheads indicate some labelled nuclei at the lateral ridge. (B-B') as in (A-A') but after 24 hr chase. EdU-labelled nuclei in (B') are on average more distant from the edge of the ridge than in (A'), but some isolated EdU-labelled nuclei remain close to the edge (pink arrowheads). (C-C') as in (A-A') but after 5 day chase. (D) Higher magnification of the area boxed with a full line in (C') showing long-term EdU retention within the lateral ridge. (D') Higher magnification of the area boxed with a dotted line in (C'), showing EdU incorporation in differentiated colloblasts (recognisable by their elongated nucleus). (E) EdU incorporation

after 12 hrs pulse and no chase in a dissected portion of the median expansion (see blue box in (G)). The dotted line on the left materialises the edge of the median ridge. Combination of EdU (green) and DAPI (red) fluorescence. Labelled nuclei are all located in the median ridge (pink arrowheads). (F) as in (E) but after 5 day chase. Strong EdU labelling is present in the muscle cell nuclei, while isolated EdU-labelled nuclei persist in the median ridge (pink arrowheads). (G) Schematic transverse view (on the left) and profile view (on the right) of the tentacle root summarising our interpretation of the EdU experiments. (H) Whole tentacle root after a 12 hrs incubation with EdU (no chase). In addition to the lateral (lr) and median (mr) ridges, there is intense cell proliferation in the aboral/external cell masses (aec). Insert: detail showing combination of EdU (green) and DAPI (red) fluorescence in the boxed area. aec: aboral/external cell masses; c: colloblasts; en: endodermal canal; lr: lateral ridge; mr: median ridge; mu: muscle cells. Scale bars: A-C': 25  $\mu$ m; D-D': 10  $\mu$ m; H: 100  $\mu$ m; insert in (H): 10  $\mu$ m.

**Fig. 4.** Expression of *PpiPiwi1*, *PpiVasa*, *PpiBruno* and *PpiPL10* in the comb rows. (A) *PpiPiwi1* expression at the oral extremity of a comb row. Combs are labelled (i, ii, etc.) from the youngest to the oldest. (B-B') Higher magnification (B) and DAPI counter-staining (B') corresponding to the area boxed in (A). (C) *PpiPiwi1* expression at the aboral extremity of a comb row. Combs are labelled (i, ii, etc.) from the youngest (arrow) to the oldest. (D) *PpiVasa* expression at the oral extremity of a comb row (labelling of combs as in (A)). (E) *PpiVasa* expression at the aboral extremity of a comb row (labelling of combs as in (C)). (F-F') Higher magnification (F) and DAPI counter staining (F') of the area boxed in (E). (G) DAPI staining of the oral extremity of a comb row (labelling of combs as in (A)). (H) DAPI staining of the aboral extremity of comb row (labelling of combs as in (C)). (I) *PpiPiwi1* expression in a mature comb. (J) *PpiVasa* expression in a mature comb. (J') *PpiVasa* expression along a comb row. (K-N) Detailed views of comb extremities showing the expression of *PpiPiwi1*, *PpiVasa*, *PpiBruno* and *PpiPL10*. (K'-N') DAPI-counterstaining of (K-N). (O) Semi-thin longitudinal section of a comb (asterisk: artefact). (P) TEM picture corresponding to the area boxed in (O). For clarity, all nuclei have been coloured in orange, and the cytoplasm of a putative stem cell has been coloured in yellow. (Q) Diagram summarising gene expression patterns in the comb rows. bl: basal lamina, c: cilia of polster cells, g♂: male gonad, g♀: female gonad, m: mesoglea; mc: lumen of a meridional canal; mi:

mitochondria; n: nucleus; nu: nucleolus; ps: polster cells. Scale bars: A, C, E, J': 100 µm; B, B', F, F': 25 µm; I, J, D: 50µm; K, L, M, N: 10µm; O: 20µm; P: 2.5 µm.

**Fig. 5.** Results of EdU incorporation experiments in the combs. All pictures are details of the extremity of a comb. First column: nuclei labelled with EdU; second column: nuclei stained with DAPI; third column: combination of EdU and DAPI fluorescence. Experimental conditions: (A-A'') pulse 12 hrs, no chase; (B-B'') pulse 12 hrs, chase 24 hrs; (C-C'') pulse 12 hrs, chase 5 days. Pink arrowheads in (B-B'') point to differentiated nuclei of polster cells, recognisable by their elongated shape. The insert in (C-C'') shows a labelled polster cell nucleus from another comb (same scale as in (C-C')). Most of the labelled nuclei in all three conditions are distributed on a crescent at the comb extremity, matching the expression zone of *PpiPiwi1*, *PpiVasa*, *PpiBruno* and *PpiPL10* (see Fig. 4). White stars in (A'',B'') indicates out of focus labelled nuclei located in the underlying gonad. Scale bars: A-B'': 10 µm; C-C'': 5 µm.

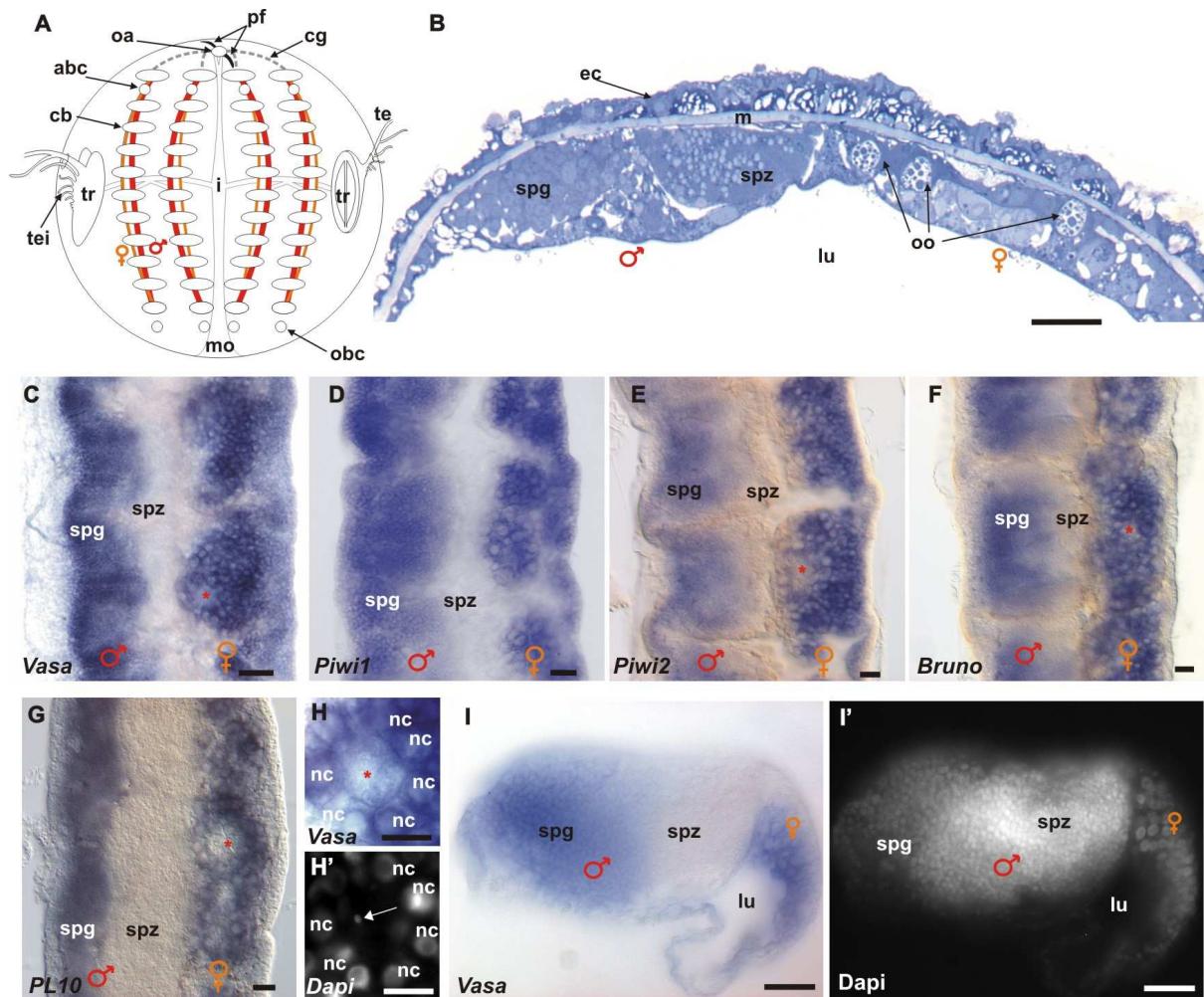
**Fig. 6.** Expression of *PpiPiwi1*, *PpiVasa*, *PpiBruno* and *PpiPL10* in the aboral sensory region. (A-D). General views of the expression patterns of *PpiPiwi1* (A), *PpiVasa* (B), *PpiBruno* (C) and *PpiPL10* (D) in the aboral sensory complex. The dotted lines delineate the marginal (mpf) and central (cpf) regions of the polar fields. (A'-D') Higher magnification of one patch of positive cells for each of the four genes. (A''-D'') DAPI counter-staining of (A'-D'). (E) DAPI preparation from a fixed but not dehydrated specimen showing the organisation of the aboral sensory complex. ao: apical organ; cpf: central zone of the polar field; mpf: marginal zones of the polar field. (F) Higher magnification of the area boxed in (E). (G) Diagram summarising gene expression patterns in the aboral sensory complex. Scale bars: A-E: 25 µm; F: 5 µm; A'-D'': 10 µm.

**Fig. 7.** Results of EdU incorporation experiments in the aboral sensory complex. First column: nuclei labelled with EdU; second column: nuclei stained with DAPI; third column: combination of EdU and DAPI fluorescence; fourth column: summary drawings showing the distribution of EdU labelled nuclei in the aboral sensory complex. Tested experimental conditions were: (A-A'') pulse 30 min, no chase; (B-B'') pulse 12 hrs, no chase; (C-C'') pulse

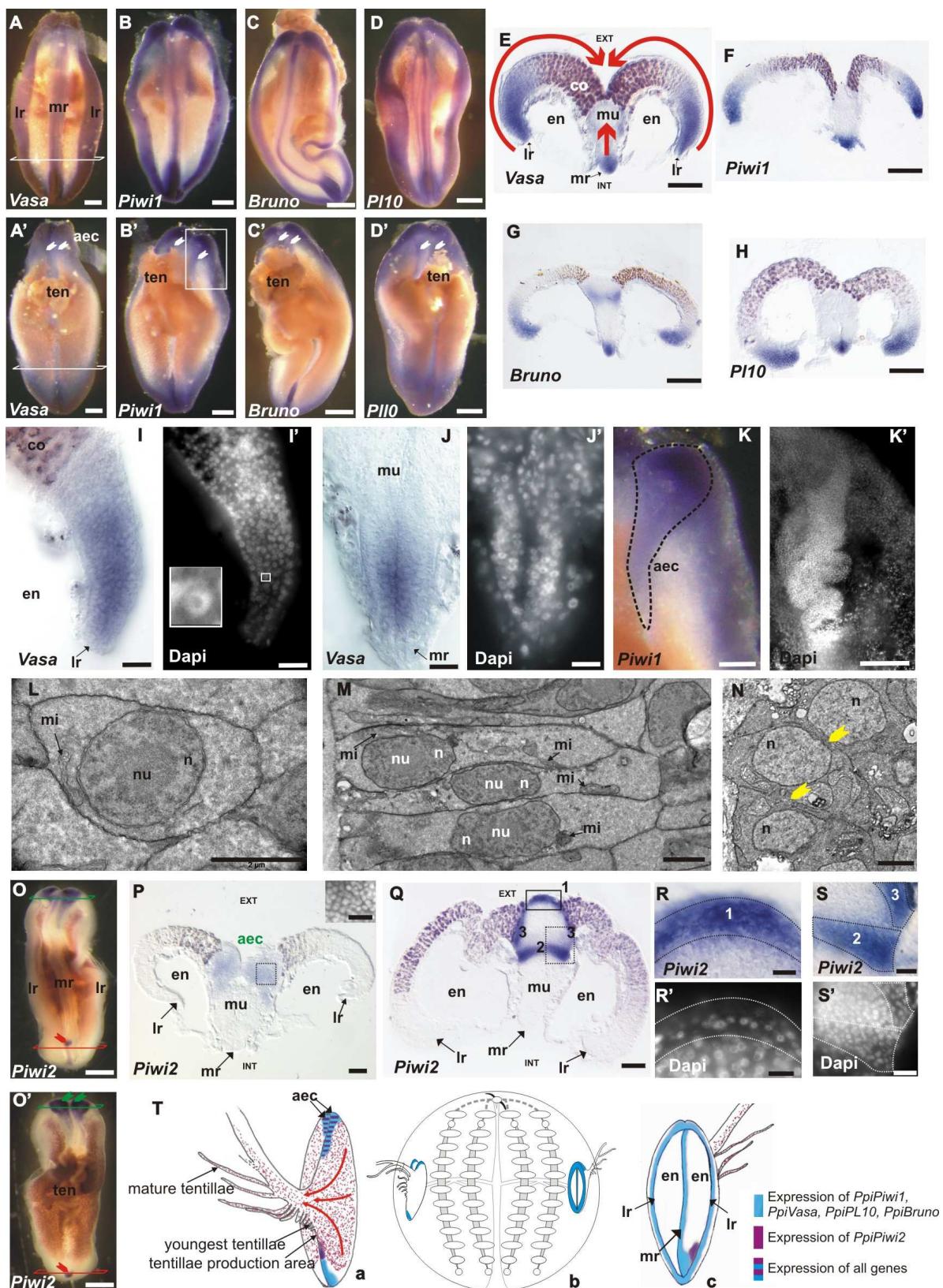
12 hrs, chase 24 hrs; (D-D'') pulse 12 hrs, chase 5 days. Dotted lines in all pictures and drawings encircle the areas in the proximal region of the polar fields where *PpiPiwi1*, *PpiVasa*, *PpiBruno* and *PpiPL10* are expressed (see Fig. 6). ao: apical organ; cpf: central zone of polar field; e: epidermis; mpf: marginal zones of polar field. Scale bars: 25  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 8.** Summary of available data on Piwi, Vasa, PL10 and Bruno expression in the germline, in multipotent stem cells with somatic and germinal derivative, and in strictly somatic stem cells. The phylogeny is according to Philippe et al. (2009). References: 1. Juliano and Wessel 2009; 2. Juliano et al., 2006; 3. Rosner et al., 2009; 4. Brown et al. ,2009; 5. Rosner et al., 2006; 6. Krovel and Olsen, 2002; 7. Houwing et al., 2007; 8. Ikenishi and Tanaka, 2000; 9. Lau et al., 2009; 10. Castrillon et al., 2000; 11. Sharma et al., 2001; 12. Foresta et al., 2000; 13. Kuramoshi-Miyagawa et al., 2010; 14. Kuramoshi-Miyagawa et al., 2001; 15. Vong et al., 2006; 16. Vagin et al., 2004; 17. Cox et al., 2000; 18. Johnston et al., 2005; 19. Snee et al., 2008; 20. Spike et al., 2008; 21. Rebscher et al., 2007; 22. Pfister et al., 2008; 23. De Mulder et al., 2009b; 24. Shibata et al., 1999; 25. Guo et al., 2006; 26. De Mulder et al., 2009a; 27 Mochizuki et al., 2001; 28. Seipel et al., 2004; 29. Denker et al., 2008; 30. Funayama et al., 2010.

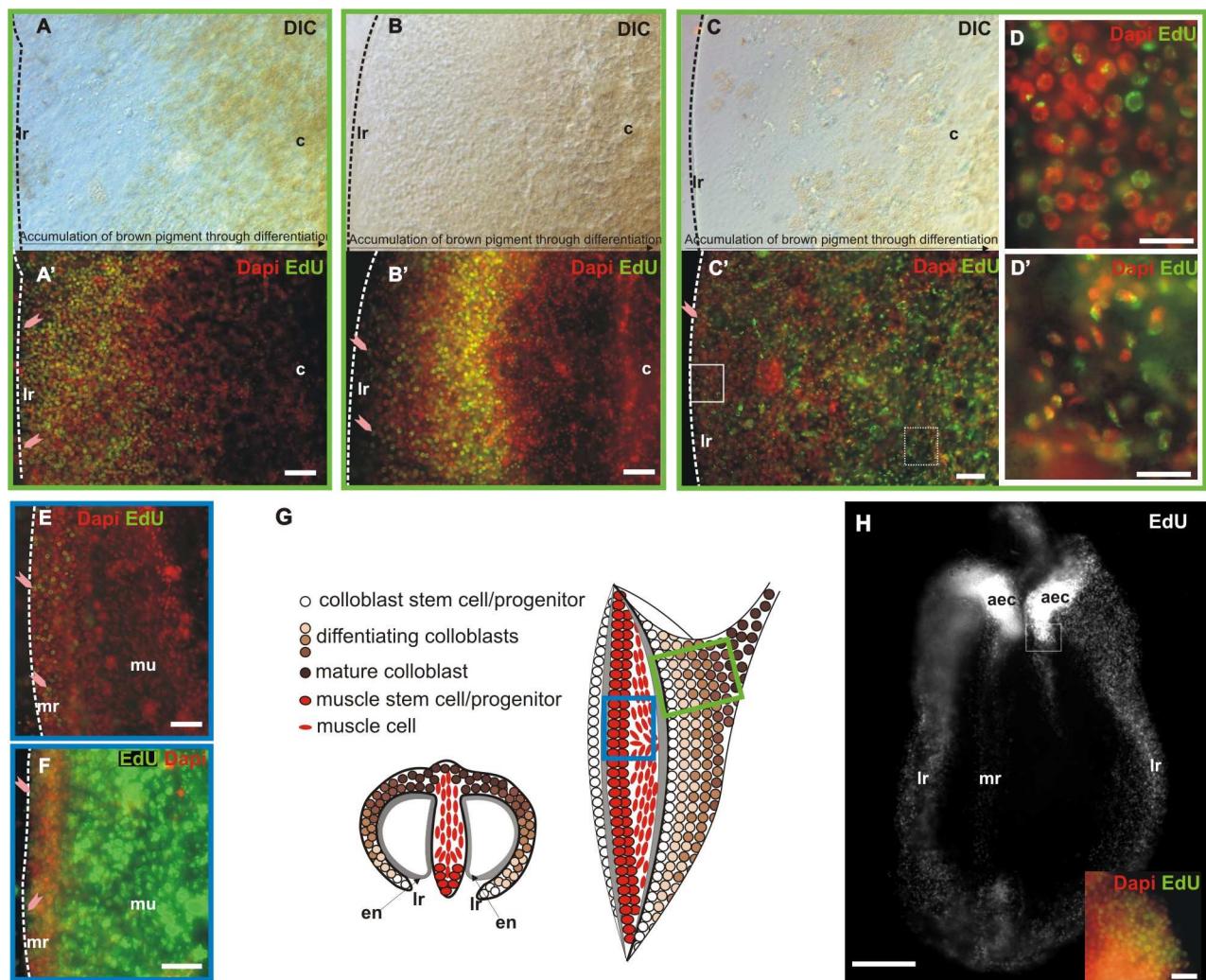
**Figure 1**



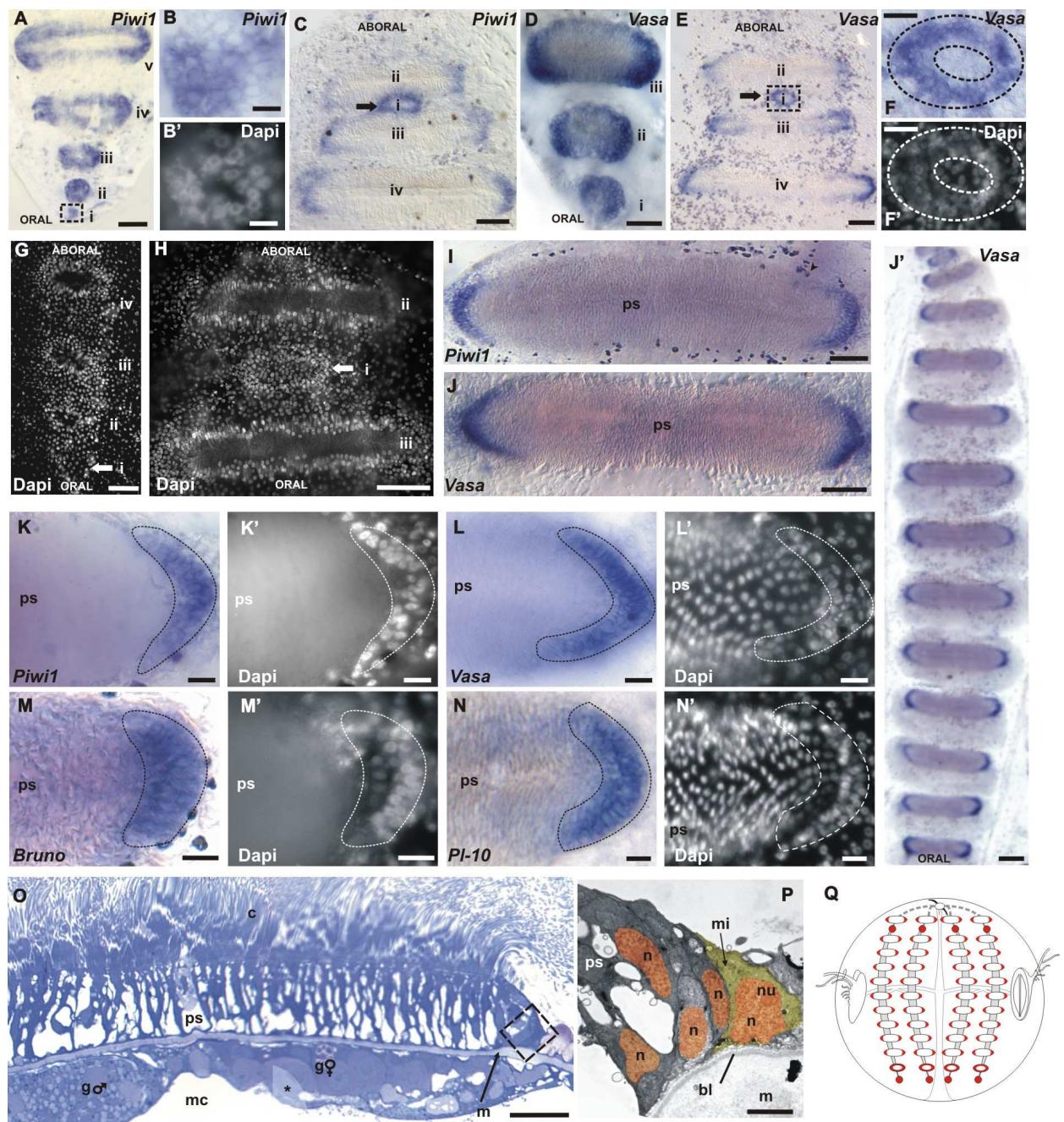
**Figure 2**



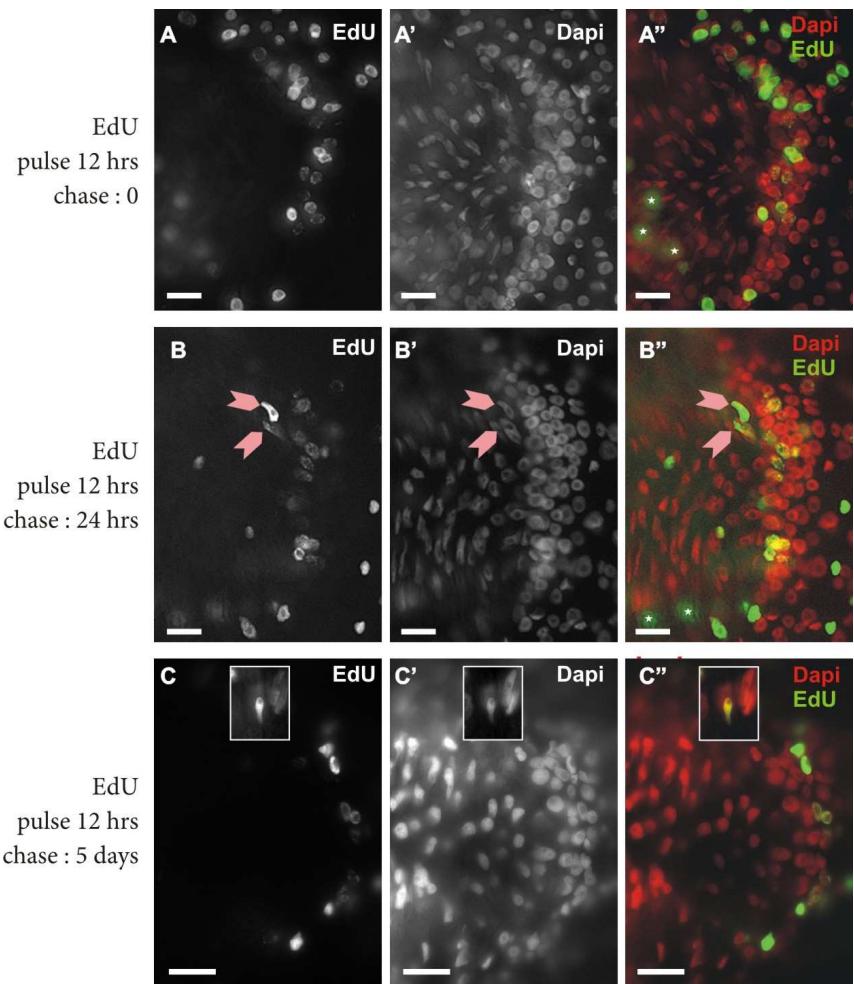
**Figure 3**



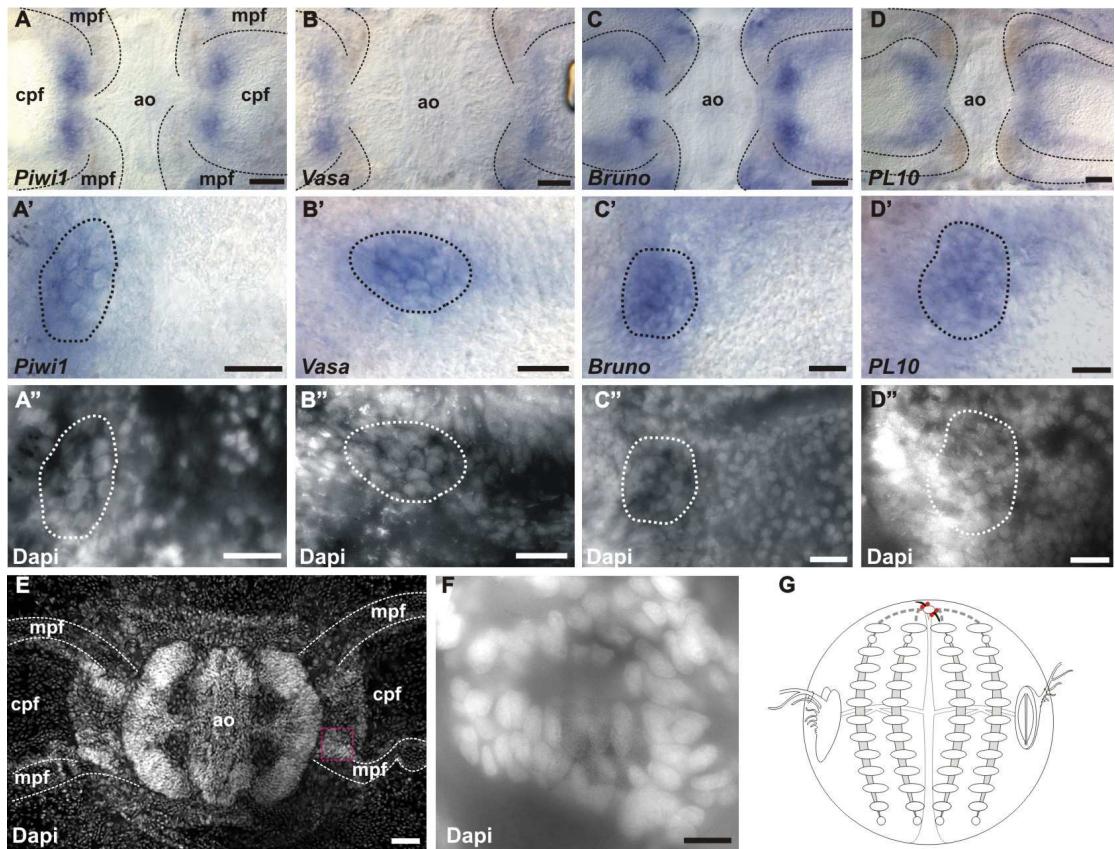
**Figure 4**



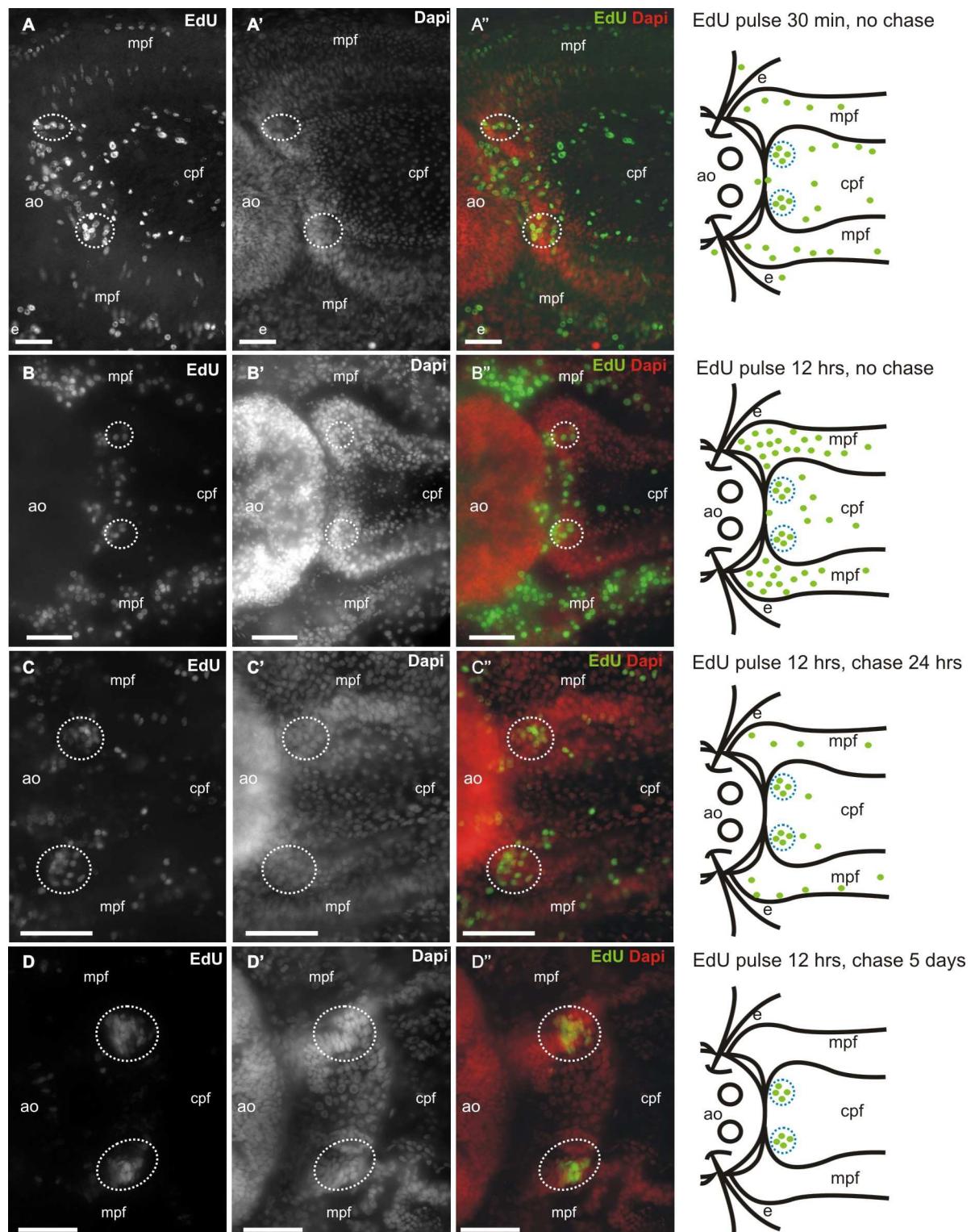
**Figure 5**



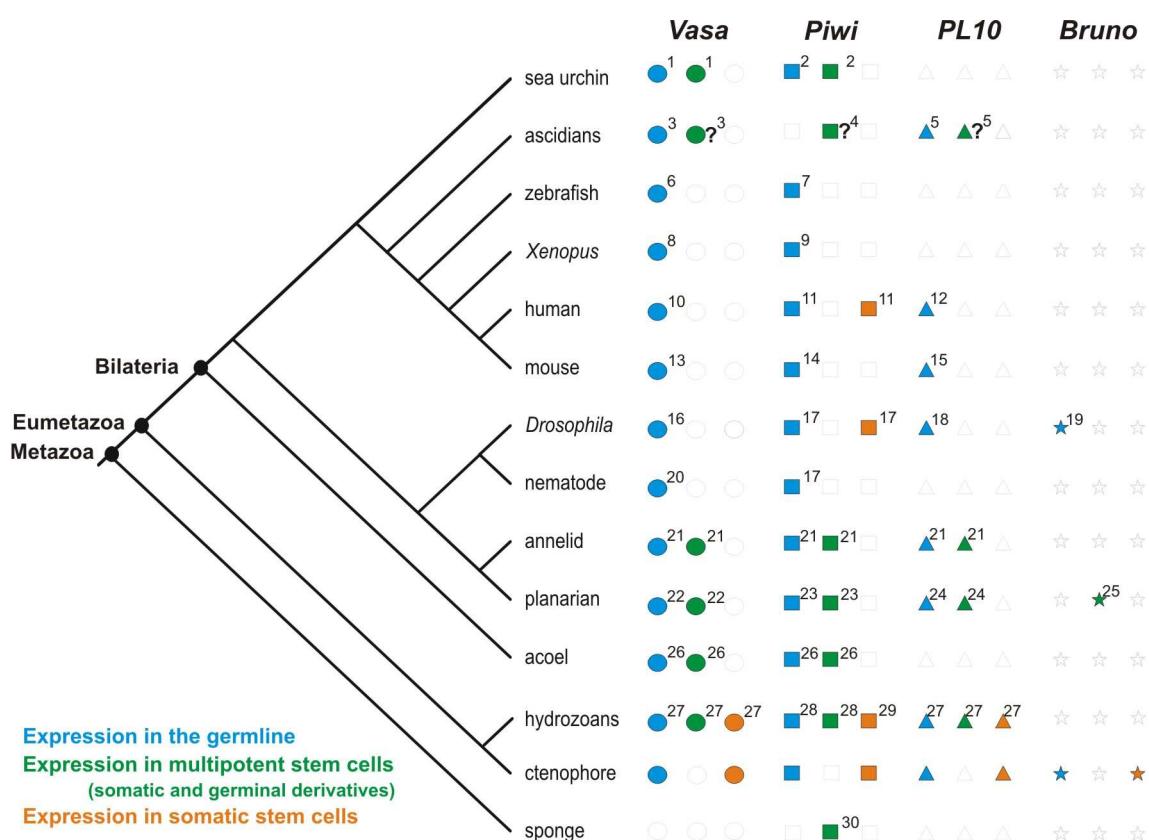
**Figure 6**



**Figure 7**



**Figure 8**



## **Somatic stem cells express Piwi and Vasa genes in an adult ctenophore: ancient association of “germline genes” with stemness**

Alexandre Alié<sup>a</sup>, Lucas Leclère<sup>a, b</sup>, Muriel Jager<sup>a</sup>, Cyrielle Dayraud<sup>a</sup>, Patrick Chang<sup>c</sup>, Hervé Le Guyader<sup>a</sup>, Eric Quéinnec<sup>a</sup>, Michaël Manuel<sup>a</sup>\*

<sup>a</sup> Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, UMR 7138 CNRS MNHN IRD, Case 05, 7 quai St Bernard, 75005 Paris, France.

<sup>b</sup> Sars International Centre for Marine Molecular Biology, University of Bergen, N-5008 Bergen, Norway (present address).

<sup>c</sup> Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, UMR 7009 CNRS, Observatoire Océanologique, 06230 Villefranche-sur-Mer, France.

## **Supplementary Figures**

*PpiVasa* :

RICNEEGHFARECPQKGEEKCFRCQESGHRVADCPQEADPDRPAPVTYVPTDDTSEASLFNNGLNSGLNFQKYSNIP  
VKVEGPKGEMYPAVNTFAELNLGDQLQSNIRRSNYTTPPIQKHALPIIVGKQDVMASAQTGSGKTAAFVLPMIKVI  
CDTGVSQQFSMSTQPDALVITPTRELAMQIHKETCKFAFNTIVKAALAYGGTSVSHQRNQMRNNNCNILIGTPGRL  
KMFVDDGTINMEKIKFLVLEADRMLDMGFKGMDMDFARHSQMPSPDVVRTLLFSATLPAEVQQVAKEFMKSRY  
LFVAVGIVGAAEANVKQIEEVQGSGKMTRIKELLSELSGSKVLFVTKKSADFLSAVLCQADLGATSIHGDRQQ  
REREALRDRTGSHPILVATSVAARGLDIPGVTHVVNVYDMPDEISEYVHRIGRTGRAGNTGTAISFFDSDNNSDLAR  
DLIRTLSDAQDVPDWLESYSMGGGGTGWGGGGGGFGGSDFRSNNNGGGGDNGWNSNNPGPEDELW

*PpiPL10* :

GGRGGGGGNRSRGGSNGYNNGGYNNQRRDDRQGGDFYGGGNYRGDSRGDYRSRSRSDYRRGNSSGGGER  
YNRQTADWSKPTNRNEALERELFGSGNTGINFDKYEDIPVATGNDVPEPIKEFTDINLGEIVQGNIKLAHYTTPTPV  
QKYSVPIIKGKRDLMACAQTGSGKTAFLPILSRINEEGPVPQIPQESNNSYNRSSAPPSNCM

*PpiPiwi1* :

KNQPLLVCRSKTKVDGAEKEVLIHLVPEVCYMTGLTDNMRSNFKVMQDLAQYTRQKPDDRKLKGLGFRNTIAESE  
GASAVLEQWGLNMAINSIDVEGRQVAPPVLLTKDGKMNIDERKAAFDNITRKNFVITSANMGNDYSVIVTSRDQA  
NAREFMETASKVGPACGINIGPNGNVVAINSdraedyinairnnaanskivvclvpndkdrydaikkhccidqips  
QLQCKNLNPKKMSVTKVVMQMNAKMGELWSVHIPMKVMYVGIDTYHDSGSSRSVGGIVASMNDACTR  
YYSKTTWQPSKQELISQLDVMSEILKAYKSNGDFDRILIFRDGVGDGQLLAVKEQELKNIKDAVQRASVDKIE  
LVFTVVTKRIQQRFFLKMGRGLNNPPPPTVDSMVTRELFDFFLVPQGVSQGTPTHYNVLEFSTTLKPDHLQQI  
AYKMCFCMYYNWTGAIRVPAPCQYAHKLAFLVGQSLHRDPSPDLADLLYYL

*PpiPiwi2* :

GVQVPGEVVPVTGRQLPSIRLILNNGPIEVDRSRNFDRITRSRFVVSSADIGNDTVICEVADRPAAAFMEAARV  
GPACGINIGSSGTIELTSGRAESYINAINTNSRIVVCIMATDSKDKYDAIKKHCCIQRPIPSQVILKRTLSNPARMLSV  
VTKIVMQMNAKMGELWGVHIPMQKVMYVGIDTYHDSGSSARSVGIVASMNNSLTKFYHRTTWQPSRQELISQM  
DVVMTDLLRMFKEKNTDYPDRILVFRDGVDGQLLAVKEIEIRSIK

*PpiAGO* :

SVEIQGLGAIVKDILKEFFKILCKCPGRIYYRDGVAEQFEGIVMQELEQIQNACTSLHETYKPQISVVVCTKMHKQRFLRQEGRPCENMPE  
GTVVDTGVTSANHRDFYLSSHQAIQGTSVPCHYYLYDDCKFTMDMWQMLSFLCHCYCRCSRVSYPAVYYAHACYNARARLLADTSIN  
WDDPPNPAQLQGIVQPMNQNNAINEFSI

*PpiBruno* :

QPKMSLIAKYHNKEVVMMDTLKLFGVQVPKNFESDLKPYFEKYGPLVNIKVRDRDSKAHKGCATFTNLDNA  
ENAMHEMHDRIALPGAKKEMQIKAVHDDDNKKFDKRLFVGMISKSLNGDELKAMFEQFGEVDCNILTSMINGEK  
MSRGCGFKFAKASSCLQAIKEMHQSQTMEGCNSPLVVKHADSPADKMKRNASGFEEREDSKRNNFRHSAGGGM  
QQRAPFGGNQYAGGNQYGNVYPIAPPQQPPPQNRQFGGNATASALISAFTPLLATVAEQNTPGTTRMLVE  
SIKIALNALHHENTTSQAQAMVSIASSLSAVANNLNKKTSSNFDHQSGGMFGNTSEFYNPAAPANNNMNSSSFG  
SGMNNYYNTTP

*PpiBruno2* :

TTLNKLIMRPPRKMIETEQSEQASRTASGIPLKDPDSIKLFIGQVPRTMMAEAELEPIFGEHGQIYELTVLRDKSSGNH  
KGCAFVTFCTLEAAERAQRSLHGSKVLPGMSRPIQVKPANSDDAOKLERKLFIGMVSQKQATETDLHGMFDQYGEIE  
ELSILKDTEGSSKGCAFIKYRTAKDCHKAIRTMHSLTMQGCSSPIVKWADTDKERVGRRLKITEGGPVPPNMPF  
NAVGGGPPPNRPGYASLMSHQQHQQHQQGPPAPPETNSALLSAITPLLHNLASQSNPETIKPW

Fig. S1. Predicted amino-acid sequences of the *Pleurobrachia pileus* genes from this study.

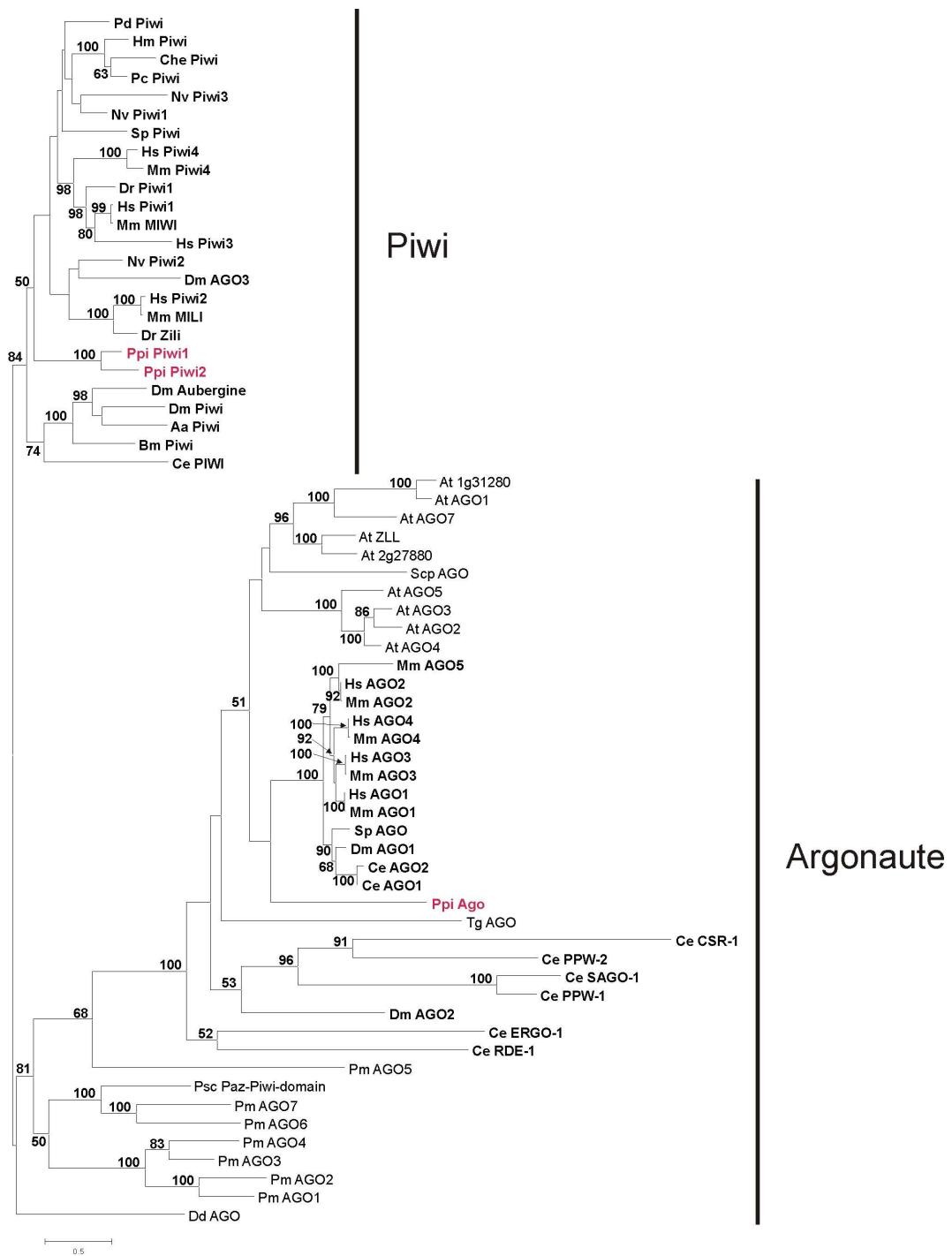
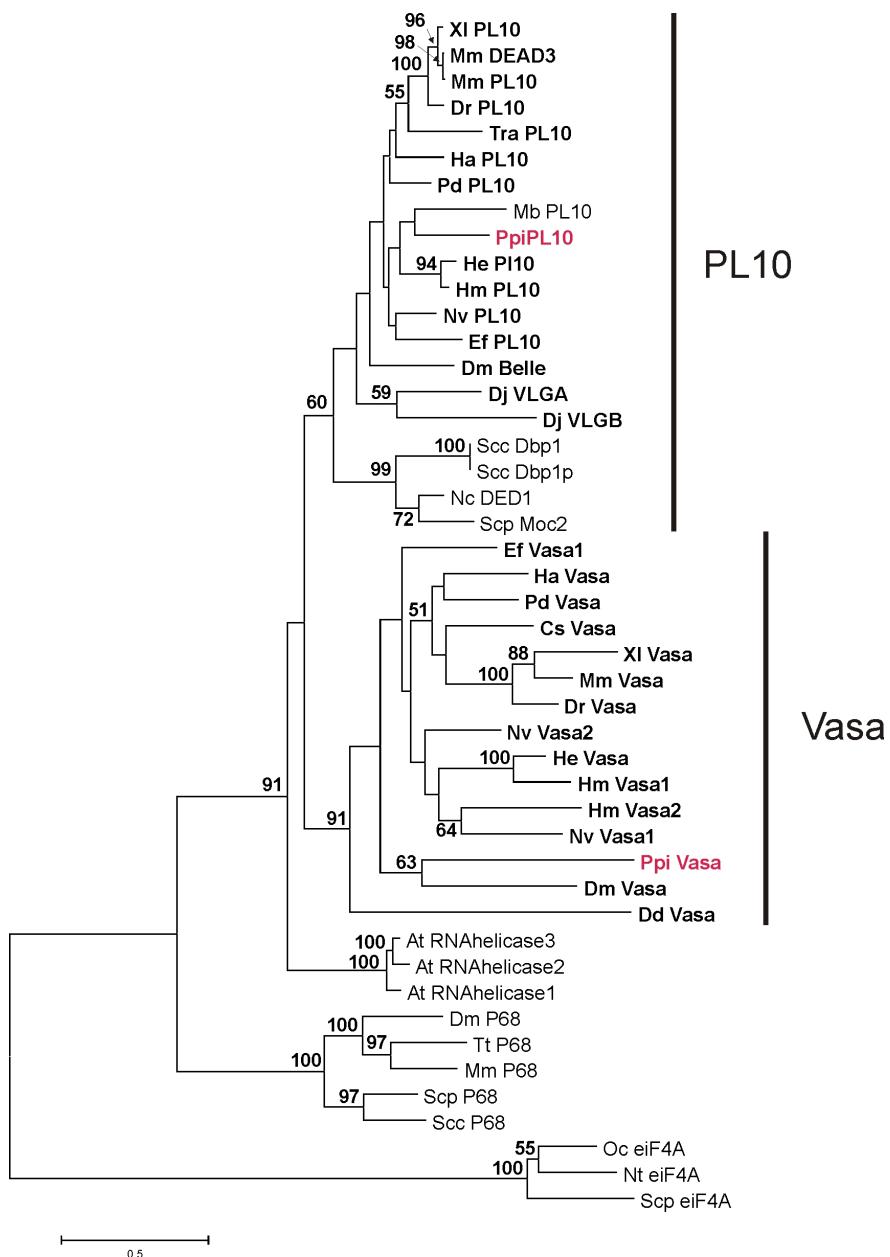


Fig. S2. (see legend on next page)

Fig. S2. Phylogenetic analysis of *Pleurobrachia* Piwi and Argonaute sequences. Amino-acid sequences were analysed using the Maximum Likelihood (ML) method (see Material and Methods for details about the analyses). Bootstrap values are indicated above or below the branches when >50%. Sequences of metazoans are indicated in bold. Abbreviations for species names: Aa: *Aedes aegypti*; At: *Arabidopsis thaliana*; Bm: *Bombyx mori*; Ce: *Caenorhabditis elegans*; Che: *Clytia hemisphaerica*; Dd: *Dictyostelium discoideum*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Dr: *Danio rerio*; Hm: *Hydra magnipapillata*; Hs: *Homo sapiens*; Mm: *Mus musculus*; Nv: *Nematostella vectensis*; Pc: *Podocoryne carnea*; Pd: *Platynereis dumerilii*; Pm: *Paramecium tetraurelia*; Ppi: *Pleurobrachia pileus*; Psc: *Pseudourostyla cristata*; Scp: *Schizosaccharomyces pombe*; Sp: *Strongylocentrotus purpuratus*; Tg: *Toxoplasma gondii*.

#### Short comment on the Piwi evolutionary history

Although many nodes are poorly resolved, the topology suggests a combination of recent, lineage-specific duplications (for example for *Piwi* and *Aubergine* in *Drosophila*, or for *MIWI* and *Piwi4/MIWI2* in mouse) and of more ancient duplications, even possibly before the divergence between cnidarians and bilaterians (indeed, one of the sea anemone paralogues groups with fly *Ago3* and mammalian *Piwi2*, while the other sea anemone genes group with the remaining mammalian paralogues). Examples of Piwi paralogues with divergent expression sites in bilaterian species include *Piwi / Aubergine* in *Drosophila* (Thomson & Lin, 2009) and *Piwi1 / Piwi2* in human (Liu, X. et al., 2009. J. Genet. Genomics 36: 591-601). Apart from these exceptions, reported expression sites of Piwi paralogues in a given bilaterian species are generally similar (Thomson & Lin, 2009).



**Fig. S3. Phylogenetic analysis of Pleurobrachia PL10 and Vasa sequences.** Amino-acid sequences were analysed using the Maximum Likelihood (ML) method (see Material and Methods for details about the analyses). Bootstrap values are indicated above or below the branches when >50%. Sequences of metazoans are indicated in bold. The outgroup consists of P68 and eukaryotic initiation factor 4A sequences. Abbreviations for species names: At: *Arabidopsis thaliana*; Cs: *Ciona savignyi*; Dd: *Dugesia dorotocephala*; Dj: *Dugesia japonica*; Dm: *Drosophila melanogaster*; Dr: *Danio rerio*; Ef: *Ephydatia fluviatilis*; Ha: *Haliotis asinina*; He: *Hydractinia echinata*; Hm: *Hydra magnipapillata*; Mb: *Monosiga brevicolus*; Mm: *Mus musculus*; Nc: *Neurospora crassa*; NT: *Nicotiana tabacum*; Nv: *Nematostella vectensis*; Oc: *Oryctolagus cuniculus*; Pd: *Platynereis dumerili*; Ppi: *Pleurobrachia pileus*; Scc: *Saccharomyces cerevisiae*; Scp: *Schizosaccharomyces pombe*; Tra: *Trichoplax adherens*; Tt: *Tubifex tubifex*; Xl: *Xenopus laevis*;

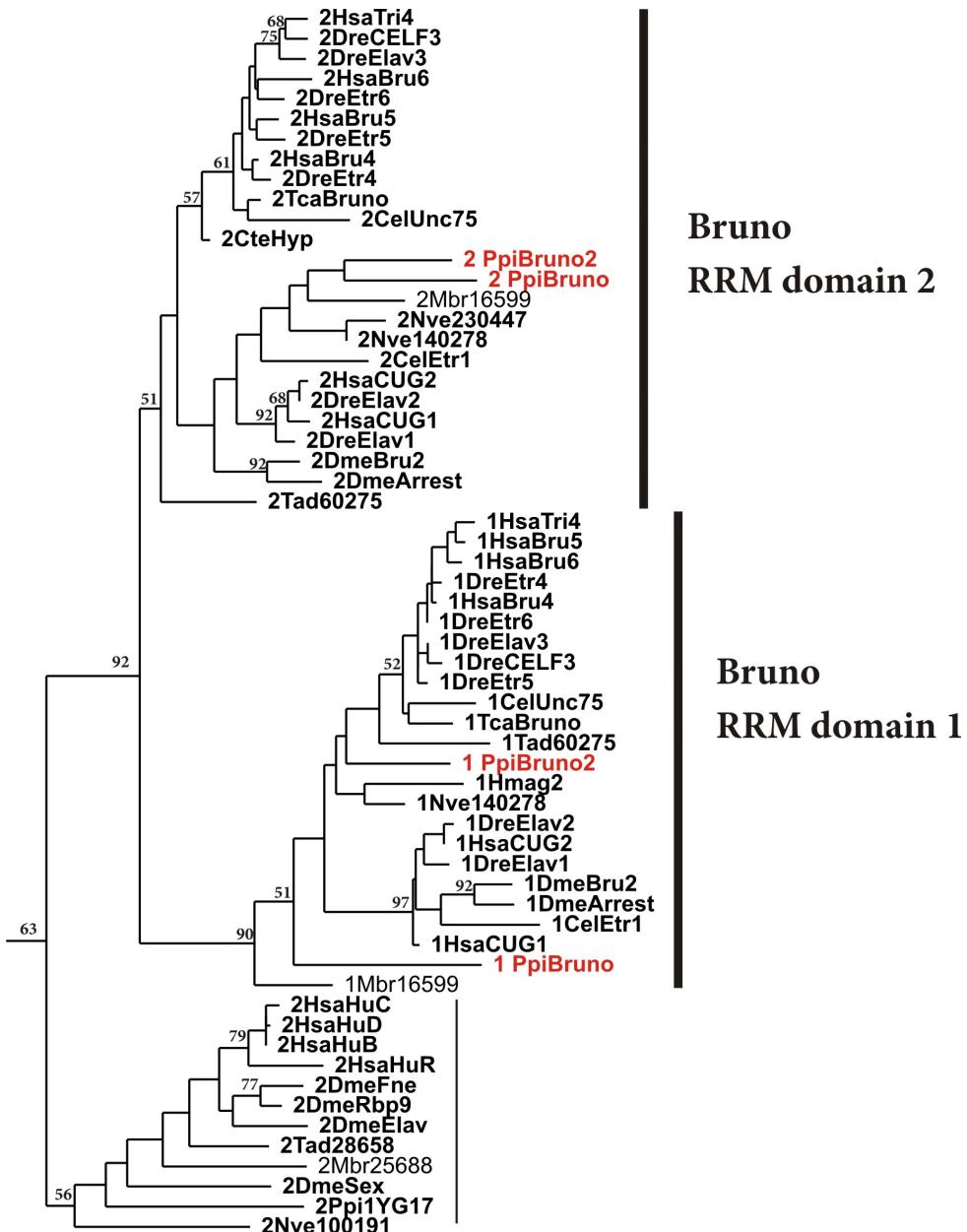


Fig. S4. Phylogenetic analysis of *Pleurobrachia* Bruno RRM domains 1 and 2 (the third RRM domain has not been included in the analysis because the *Pleurobrachia* sequences are not complete and lack the 3<sup>rd</sup> domain). Amino-acid sequences were analysed using the Maximum Likelihood (ML) method (see Material and Methods for details about the analyses). Bootstrap values are indicated above or below the branches when >50%. Sequences of metazoans are indicated in bold. The outgroup consists of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> RRM domains of Elav (only the latter being shown here for clarity). Abbreviations of taxon names as follows: Cel: *Caenorhabditis elegans*; Cte: *Capitella capitata*; Dme: *Drosophila melanogaster*; Dre: *Danio rerio*; Hmag: *Hydra magnipapillata*; Hsa: *Homo sapiens*; Mbr: *Monosiga brevicollis*; Nve: *Nematostella vectensis*; Tad: *Trichoplax adhaerens*; Tca: *Tribolium castaneum*.

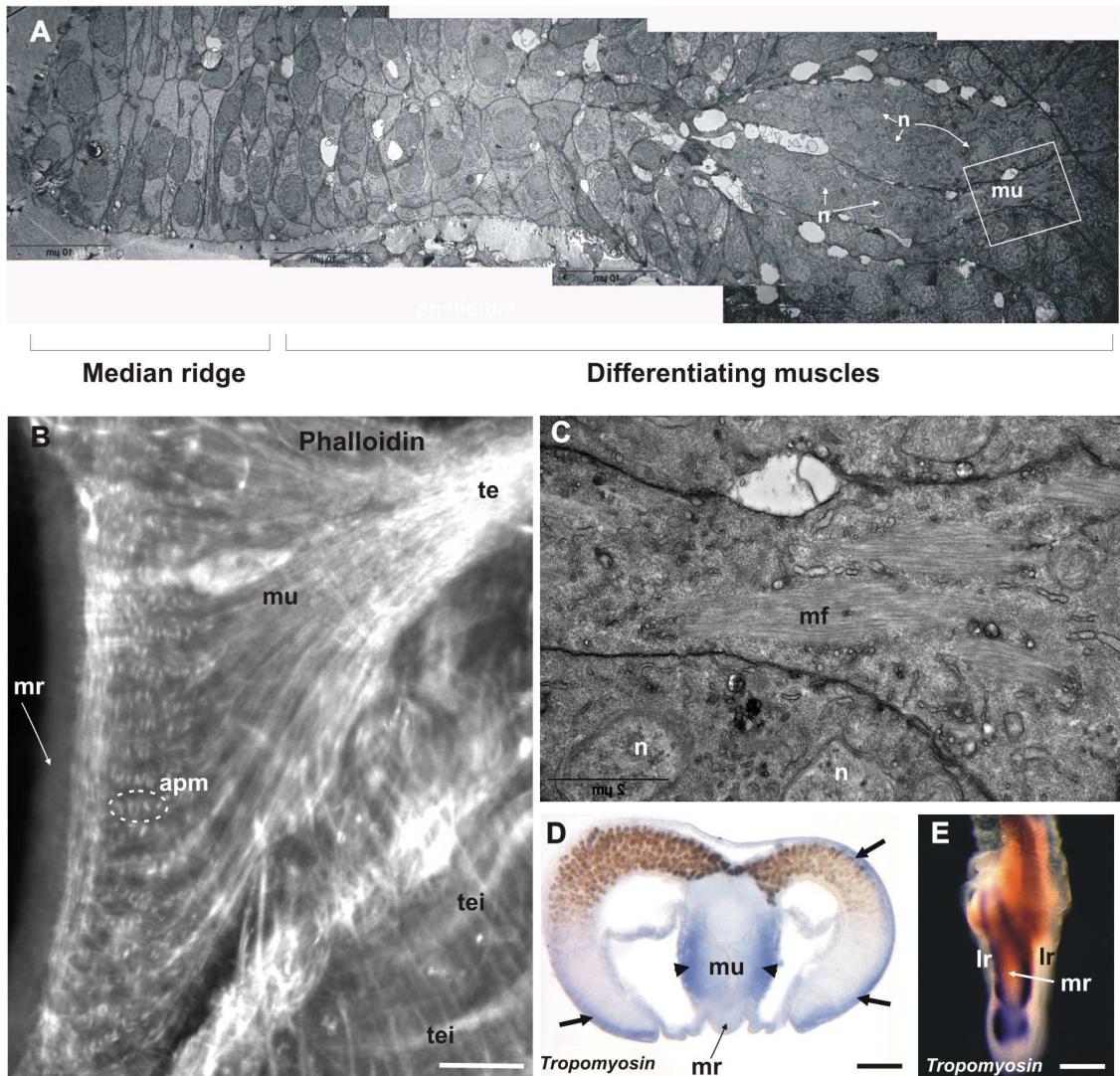


Fig. S5. Additional information about differentiation of tentacle muscle. (A) TEM transverse section of the median expansion, with the median ridge on the left and muscle cell differentiation progressing to the right. On the right part of the picture, several polynucleated muscle fibers (mu) are visible. (B) Phalloidin staining of a tentacle root in profile view (lateral expansions removed). The median ridge (mr) is visible on the left and shows very low actin content. Actin accumulates in myoblasts. Then myoblasts become aligned (apm: aligned progenitors of muscle cells). More proximally myoblasts have fused to give polynucleated muscle fibers (mu). The muscle fibers converge towards the base of the tentacle (te). Also visible on the picture are muscle fibers of forming tentillae (tei). (C) Higher magnification of the area boxed in (A): detailed view of a muscle cell, with myofilaments (mf) visible in the cytoplasm. (D-E) Expression in the tentacle root of a molecular marker of muscle cell differentiation (*PpiTropomyosin*). (D) Cryogenic transverse section (compare with Fig. 2E-H and Q). The staining is seen in the differentiating muscle cells of the tentacle root (arrowheads) and in the tentacle sheath epithelium that surrounds the tentacle root (arrows). (E) Whole mount internal view (compare with Fig. 2A-D and O). apm: aligned progenitors of muscle cells; lr: lateral ridge; mf: myofilaments; mr: median ridge; mu: muscle cells; n: nucleus; te: tentacle; tei: tentilla. Scale bars: A: 10 µm; B, D: 50 µm; C: 2 µm; E: 100 µm.

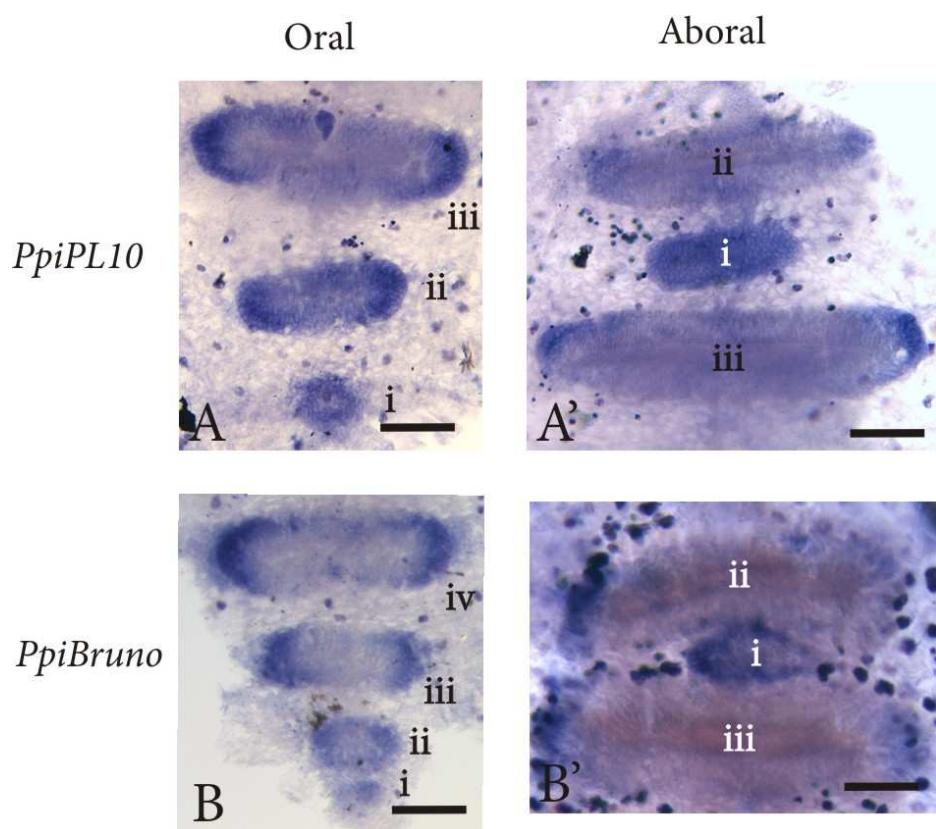


Fig. S6. Expression of *PpiPL10* and *PpiBruno* at the extremities of the comb rows. (A) *PpiPL10* expression at the oral extremity of a comb row. (A') *PpiPL10* expression at the aboral extremity of a comb row. (B) *PpiBruno* expression at the oral extremity of a comb row. (B') *PpiBruno* expression at the aboral extremity of a comb row. Combs are labelled (i, ii, etc.) from the youngest to the oldest in all pictures. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ .

# 3

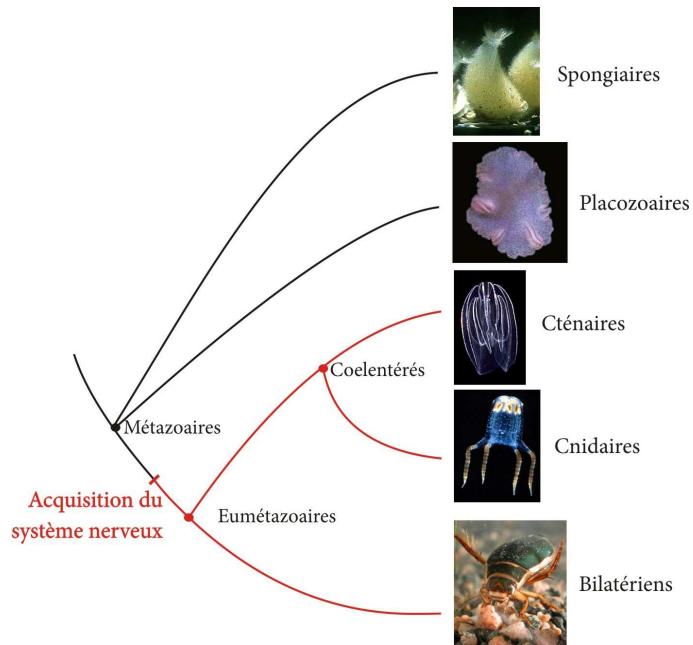
## Le problème de l'origine du système neuro-sensoriel : contributions touchant à l'évolution des synapses chimiques

### 3.1. Introduction. L'origine du système neuro-sensoriel : innovations et co-options

#### 3.1.1. L'acquisition du système nerveux : une réalité particulièrement complexe

Ainsi que nous l'avons discuté précédemment au § 1.2.2.-C, la monophylie des eumétazoaires – cnidaires, cténaires et Bilateria - implique une origine unique du système nerveux selon le scénario le plus parcimonieux (Fig. 35). Toutefois, la notion de système nerveux est complexe et rassemble une myriade de facettes : diversité des cellules nerveuses, des gènes de la neurogenèse, des protéines impliquées dans la communication nerveuse ou la structure des synapses. Chacune de ces facettes a sa propre histoire car, comme nous allons le voir, tous les composants du système nerveux n'ont pas été acquis en une seule fois, chez un seul et même ancêtre commun. Dès lors on peut se demander en quoi consiste au juste « l'acquisition du système nerveux ». Et surtout, dans quelle mesure cette emblématique innovation des eumétazoaires utilise des outils qui sont plus anciens que l'apparition du système nerveux lui-même. Il faut tout d'abord s'accorder sur la définition du système nerveux. Il existe deux grands types de définition suivant les auteurs. Certains auteurs récents tendent à adopter une définition essentiellement fonctionnelle : « *a system that conducts information in a directed way through the body via electrical and/or chemical signals, and cells specialised for these functions* » (Schmidt-Rhaesa 2007, Nickel 2010). L'idée de canalisation et de directionnalité dans la transmission de l'information est fondamentale dans cette définition ; il faudrait y ajouter que l'information y est conduite de manière particulièrement rapide. La définition traditionnelle du système nerveux est plus restrictive et donne plus d'importance aux critères morphologiques et à la notion de neurone. Elle

remonte à la théorie neuronale de Ramon y Cajal (1937) et est ainsi résumée par Bullock et Horridge (1965) : « *all nervous system consist in essence [...] of distinct cells called neurons, which are specialized for nervous functions and which produce prolongations and branches* ». Il faut noter que pour l'une comme pour l'autre de ces deux définitions, les spongiaires et les placozoaires sont les seuls métazoaires à ne pas posséder de système nerveux (Nickel 2010), et la présence d'un système nerveux caractérise les eumétazoaires à l'exclusion de tout autre taxon de l'arbre du vivant.

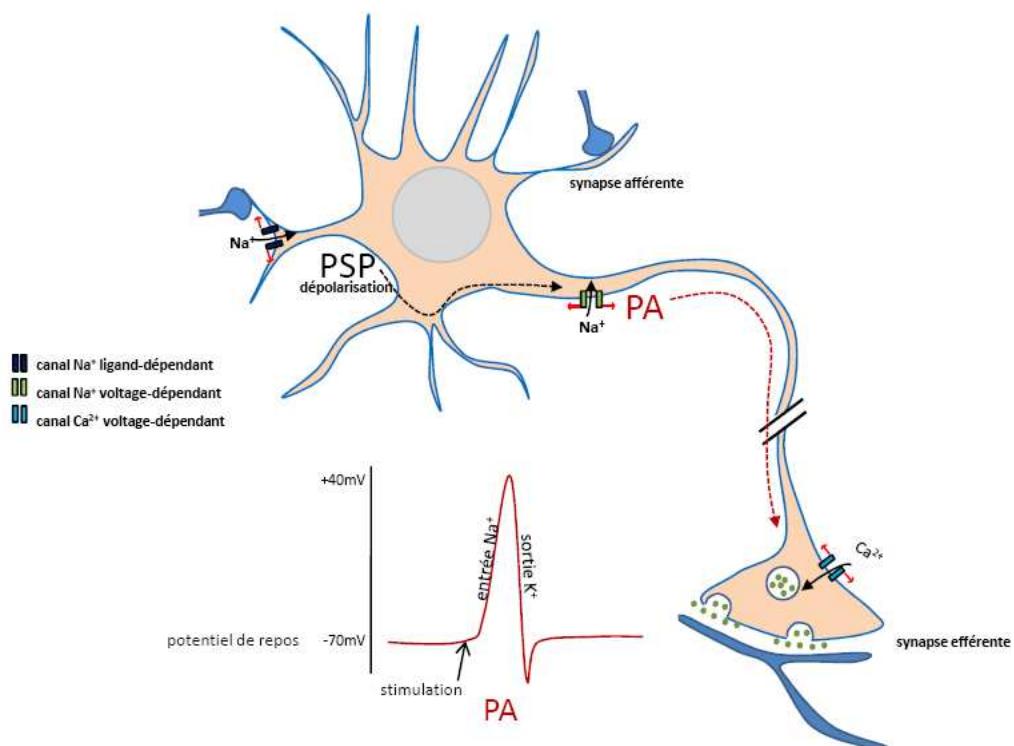


**Figure 35.** Arbre phylogénétique des métazoaires montrant l'apparition du système nerveux chez un ancêtre commun des eumétazoaires. Les éponges (spongiaires) et le placozoaire *Trichoplax adhaerens* ne possèdent pas de système nerveux. *Phylogénie d'après Philippe et al. (2009)*.

A l'échelle cellulaire, l'unité fonctionnelle la plus fondamentale du système nerveux est le neurone (Fig. 36). Du point de vue morphologique, cette cellule possède un corps cellulaire à partir duquel sont projetées des expansions cytoplasmiques, les neurites. Dans les neurones de Bilateria, ces neurites sont spécialisés en axone (émetteur) et dendrites (récepteurs), mais une telle polarisation du neurone à travers la spécialisation des neurites n'existe pas chez les non Bilateria (cténaires et cnidaires<sup>12</sup>). Chez les bilatériens, la réception sur le corps cellulaire ou l'arbre dendritique du message provenant d'une synapse afférente conduit à une modification du potentiel de membrane appelée le potentiel post-

<sup>12</sup> De rares exceptions sont documentées. Ainsi, deux axones géants parcourent le stolon de la colonie du siphonophore *Nanomia bijuga* (Mackie 1973).

synaptique (PSP). Celui-ci peut être excitateur (dépolarisation) ou inhibiteur (hyperpolarisation) ; il est décrémentiel et codé en amplitude. A la base de l'axone, la sommation de tous les PSP produits au niveau des synapses afférentes (il peut y avoir plusieurs milliers pour un seul neurone) conduit (ou non) à la production d'un potentiel d'action (PA), qui est auto-entretenue et d'amplitude stéréotypée (Fig. 36). Le message nerveux est alors codé en fréquence de PA. L'arrivée du PA au niveau d'une synapse efférente provoque la libération de neurotransmetteur dans la fente synaptique.



**Figure 36.** Schéma du fonctionnement d'un neurone de vertébré. L'action du neurotransmetteur au niveau d'une synapse afférente (ici dans le cas d'une synapse excitatrice) provoque l'ouverture de canaux sodium ligand-dépendants, ce qui crée un potentiel post-synaptique (PSP). A la naissance de l'axone (segment initial), la somme des PSP est convertie en fréquence de potentiels d'action (PA) par l'intermédiaire de canaux sodium voltage-dépendants. Le PA est transmis jusqu'à la synapse efférente et provoque l'exocytose des vésicules contenant le neurotransmetteur (points verts) vers la cellule cible (colorée en bleu). Le PA présente une phase de dépolarisation suite à l'entrée de sodium, puis une phase de repolarisation, suivie d'une hyperpolarisation due à la sortie de potassium. *Figure originale.*

Nous verrons toutefois (§ 3.1.2.) que le neurone ne constitue pas un type cellulaire très tranché, car il existe une sorte de continuum morphologique et fonctionnel entre neurones, neurones sensoriels et cellules sensorielles *sensu stricto*. Puis dans le paragraphe 3.1.3, nous passerons à la loupe les différentes caractéristiques qui font l'identité des cellules neuro-sensorielles. Parmi ces caractéristiques, la détection de stimuli environnementaux et la formation puis la conduction des

potentiels d'action semblent être des caractéristiques plésiomorphes co-optées par les eumétazoaires pour la fonction nerveuse. En effet du point de vue fonctionnel, le rôle du neurone repose largement sur le fonctionnement de canaux ioniques qui permettent la conduction du message nerveux, c'est-à-dire d'une impulsion électrique correspondant à une variation transitoire du potentiel de la membrane. Comme toutes les cellules vivantes, la physiologie du neurone implique donc une modification de la conductance ionique de la membrane. Nous verrons qu'il existe également des potentiels de membrane et des potentiels d'action dans des cellules non nerveuses d'animaux (les cellules musculaires par exemple), mais également chez de nombreux eucaryotes non métazoaires. Le potentiel d'action n'est donc pas une innovation concomitante à l'apparition des neurones.

Ce qui paraît en revanche être une innovation des eumétazoaires est le fait que ces organismes, pluricellulaires, possèdent un type cellulaire spécialement dévolu à la fonction nerveuse. Ceci se traduit par l'existence chez les eumétazoaires d'un réseau de gènes régulateurs impliqués dans la mise en place du neurone (et plus largement des cellules neuro-sensorielles). Là encore nous verrons que les récentes avancées dans le domaine de la génomique nous apprennent qu'une partie de ces gènes est héritée d'ancêtres communs plus anciens que l'ancêtre des eumétazoaires, alors qu'une autre partie constitue de vraies innovations des eumétazoaires.

L'apparition du système neuro-sensoriel est par ailleurs très intimement liée à l'acquisition des synapses chez les eumétazoaires. Typiquement dans les neurones de Bilateria, le message est conduit depuis les neurites vers le corps cellulaire dans l'arbre dendritique, et depuis le corps cellulaire vers une synapse le long de l'axone. La synapse, qui peut être électrique ou chimique, est une jonction cellulaire spécialisée dans la communication nerveuse. La synapse électrique est une jonction communicante (ou « *gap junction* »), au niveau de laquelle des canaux formés de connexine mettent en communication les cytoplasmes des deux cellules en contact. Cette jonction « gap » et la protéine connexine sont des innovations du clade des eumétazoaires, étant présentes chez les cnidaires, les cténaires et les Bilateria, et absentes chez les éponges et les placozoaires (Shestopalov & Panchin 2009). La synapse chimique (Fig. 36) est une zone spécialisée d'exocytose et de transmission paracrine, restreinte à une petite surface des deux cellules en contact, et qui ne se rencontre chez aucun organisme vivant en dehors des eumétazoaires. Elle implique également des complexes protéiques spécialisés impliqués dans l'adhésion, la structure du cytosquelette sous-jacent, la ségrégation spatiale des récepteurs et autres protéines membranaires de la synapse, et la plasticité synaptique. Aucune de ces caractéristiques de la synapse chimique considérée isolément n'est véritablement propre aux eumétazoaires, mais la conjugaison de tous ces modules pour assurer la communication nerveuse est bel et bien une innovation (une synapomorphie) de ce clade.

### 3.1.2. Au-delà du neurone : le continuum neuro-sensoriel et ses implications évolutives

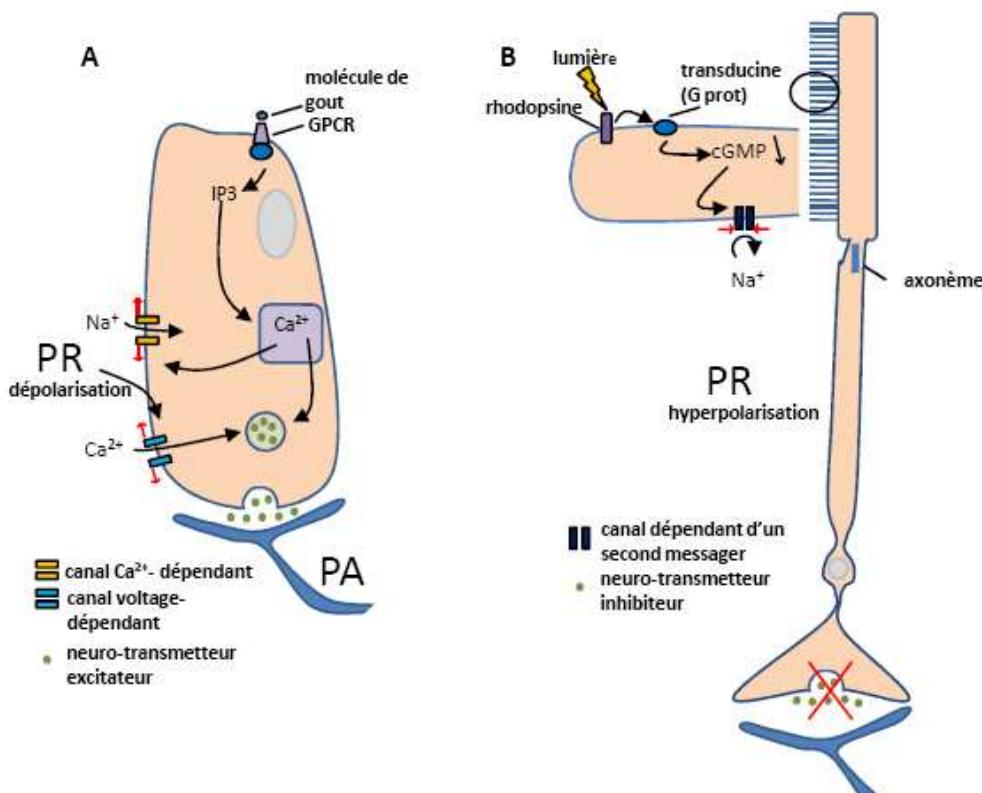
On distingue classiquement les neurones des cellules sensorielles (ou récepteurs), qui sont spécialisées dans la perception d'un stimulus environnemental (y compris dans le cadre de l'intéroception). En réalité, cette distinction est beaucoup moins tranchée qu'il n'y paraît. Neurone et cellule sensorielle, plutôt que deux types cellulaires parfaitement distincts, semblent représenter les deux pôles d'un continuum morphologique et physiologique.

Qu'est-ce qui distingue traditionnellement neurone et cellule sensorielle ? A travers l'ensemble des métazoaires, les cellules sensorielles présentent une grande diversité morphologique et fonctionnelle (voir p. ex. Fig. 37, Fig. 38), mais elles présentent également une unité remarquable qui tient surtout à la présence, chez la grande majorité d'entre elles, d'un ou plusieurs cils, sièges de la réception du stimulus sensoriel<sup>13</sup>. Ce cil est parfois peu modifié (p. ex. dans le cas de certaines cellules mécanoréceptrices) ou au contraire très fortement dérivé dans sa structure (p. ex. segment externe des cônes et bâtonnets de la rétine des vertébrés, Fig. 37B), mais toutefois reconnaissable comme cil grâce à la présence d'un axonème, au moins à sa base. La présence d'un cil n'est toutefois pas un caractère absolu de distinction entre cellules sensorielles et neurones, car de nombreux neurones sont également ciliés. C'est le cas par exemple de la majorité des neurones de l'hydre, chez les cnidaires (Grimmelikhuijzen & Westfall 1995). On connaît également des exemples de neurones ciliés chez les Bilateria, y compris chez les vertébrés (Vigh-Teichmann & Vigh 1983). Au cours de notre exploration immunocytochimique du système nerveux de *Pleurobrachia pileus* (article 4, annexe 1), nous avons pu mettre en évidence pour la première fois l'existence de neurones ciliés chez les cténaires. La fonction de ces cils neuronaux n'est pas claire.

Chez les Bilateria, les cellules sensorielles « au sens strict » (appelées aussi cellules sensorielles secondaires) sont des cellules épithéliales dépourvues d'axone. La réception du stimulus génère un potentiel de membrane appelé potentiel de récepteur, décrémentiel et codé en intensité (Fig. 37). Ces cellules ne peuvent pas générer elles-mêmes de potentiel d'action mais elles établissent des contacts synaptiques avec des neurones. Le potentiel de récepteur influe sur la libération de neurotransmetteur au niveau de ces synapses ce qui modifie la fréquence des potentiels d'action au niveau des neurones post-synaptiques. Ce mécanisme est mis en jeu par exemple dans le cas du récepteur du goût des vertébrés (Fig. 37A), ou encore dans le cas des photorécepteurs de la rétine, également chez les vertébrés (Fig. 37B).

---

<sup>13</sup> Il existe des exceptions, p. ex. récepteurs du goût chez les vertébrés (Fig. 37A).

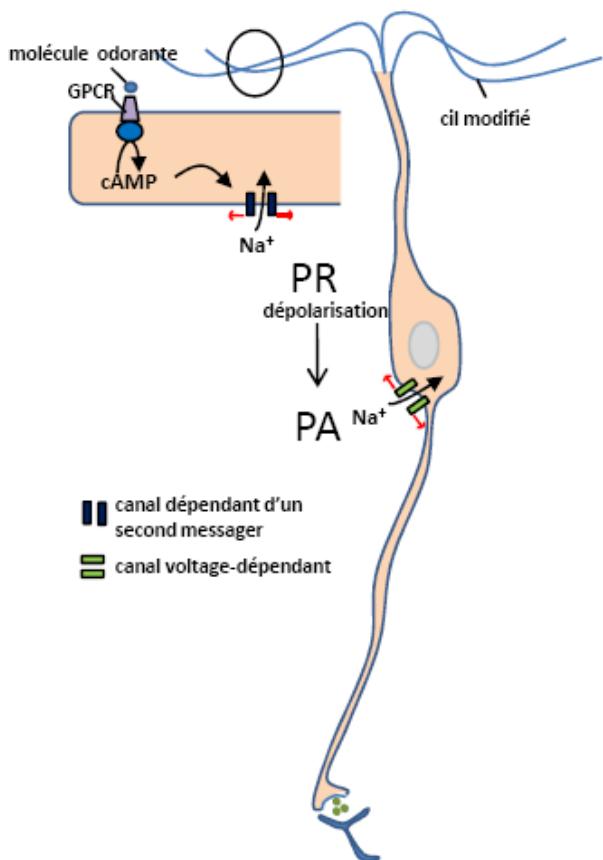


**Figure 37.** (A) Le récepteur du bourgeon du goût des vertébrés. La fixation d'une « molécule de goût » sur un récepteur couplé à une protéine G induit la libération de calcium par l'intermédiaire de l'IP<sub>3</sub>. La libération du calcium provoque l'ouverture de canaux sodium, ce qui crée un potentiel de récepteur (PR). L'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants, ainsi que la libération de calcium depuis les compartiments intra-cellulaires, provoquent l'exocytose des vésicules contenant des neurotransmetteurs, et la création d'un potentiel d'action (PA) dans le neurone qui fait synapse avec la cellule réceptrice. (B) Le bâtonnet de la rétine des vertébrés possède un segment externe qui est un cil très modifié, reconnaissable à son axonème. L'excitation de la rhodopsine par la lumière déclenche une cascade de transduction qui aboutit à la fermeture des canaux sodium. Le potentiel de récepteur (PR) consiste en une hyperpolarisation de la membrane, limitant la libération de neurotransmetteur inhibiteur au niveau de la synapse avec la cellule bipolaire. *Figure originale.*

En revanche, chez les Bilateria une autre catégorie de récepteurs (appelés suivant les auteurs cellules sensorielles primaires, neurones sensoriels, ou cellules neuro-sensorielles<sup>14</sup>) représente clairement un intermédiaire entre le neurone classique et la cellule sensorielle *sensu stricto*. Ces récepteurs sont pourvus d'un axone qui se projette dans le système nerveux central. Le potentiel de récepteur est converti en modulation de fréquence de potentiels d'actions au niveau de la membrane du récepteur

<sup>14</sup> Il existe une certaine confusion autour de l'emploi de cet adjectif « neuro-sensoriel » (voir discussion dans Nickel 2010). Certains auteurs l'emploient dans un sens strict, distinguant les cellules sensorielles (au sens strict, i.e. sans axone), les cellules neuro-sensorielles (avec axone) et les neurones. Mais on trouve aussi ce terme employé dans le sens large, pour désigner toutes les cellules appartenant au continuum neuro-sensoriel. C'est ce second sens que je préfère employer dans cette thèse.

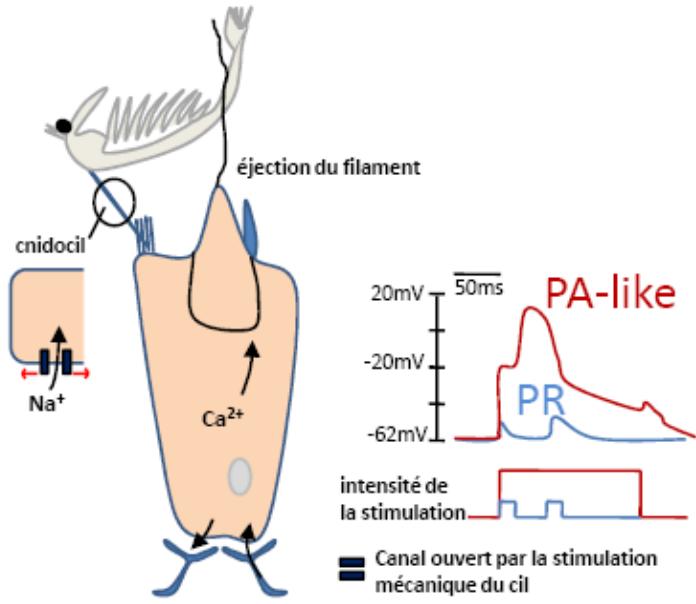
lui-même, à la base de l'axone. C'est le cas, par exemple, du récepteur olfactif des vertébrés (Fig. 38), ou encore des chémorécepteurs et mécanorécepteurs des arthropodes.



**Figure 38.** Le récepteur olfactif des vertébrés. Lorsqu'une molécule odorante se fixe, sur les cils modifiés de la cellule, à un récepteur couplé à une protéine G, cela provoque l'ouverture de canaux sodiques et la création d'un potentiel de récepteur (**PR**). A la naissance de l'axone, le PR est transformé en potentiel d'action (**PA**) suite à l'ouverture de canaux sodiques voltage-dépendants. Le PA est conduit jusqu'à la synapse efférente pour conduire à la libération de neurotransmetteur vers le neurone qui fait synapse avec la cellule réceptrice. *Figure originale.*

On se trouve donc en présence d'un continuum avec à une extrémité, les cellules épithéliales ciliées (dont la cellule sensorielle secondaire est un type spécialisé), et à l'autre extrémité le neurone « typique ». L'existence de ce continuum est soutenue par quelques arguments supplémentaires. Ainsi, il existe chez les Bilateria des cellules à morphologie de neurone, intégrées dans des réseaux nerveux, mais incapables de produire un PA, comme c'est par exemple le cas des neurones bipolaires de la rétine des vertébrés (Protti & Llano 1998). A l'inverse, la stimulation mécanique du cil d'un cnidocyte de cnidaire (cellule dépourvue d'axone), au delà d'un certain seuil, peut provoquer un pic de dépolarisation assimilable à un potentiel d'action (Brinkmann et al. 1996) (Fig. 39). Par ailleurs, chez les cnidaires, on ne peut pas distinguer de récepteurs sensoriels primaires et secondaires, toutes les cellules sensorielles (y compris les cnidocytes) présentant un cil à un pôle, la capacité d'émettre des potentiels d'action, ainsi que des synapses. Les neurones étant également ciliés et pourvus de neurites,

la distinction neurone/cellule sensorielle est particulièrement floue dans ce phylum (Grimmelikhuijzen & Westfall 1995).



**Figure 39.** Le cnidocyte des cnidaires. La stimulation du cnidocil par une proie provoque l'ouverture de canaux sodiques, pouvant conduire à deux types de réponses. Si l'excitation est d'une intensité modérée un potentiel de récepteur (**PR**) est généré. Si l'excitation est assez intense pour que le PR atteigne le seuil de -20mV, une dépolarisation stéréotypée a lieu. Elle est assimilable à un potentiel d'action (**PA-like**). Le lien entre le PA-like est la décharge du filament n'est pas clair, mais le cnidocyte est un récepteur-effecteur autonome. Le cnidocyte établit également des synapses afférentes et efférentes avec le réseau nerveux, permettant de coordonner la décharge de plusieurs cnidocytes. *Figure originale.*

Enfin, le fait qu'au cours du développement chez les Bilateria comme chez les cnidaires, la différenciation des cellules sensorielles et des cellules nerveuses met en jeu en grande partie les mêmes gènes régulateurs (p. ex. facteurs de transcription à bHLH du complexe Achaete-scute chez la drosophile, Dambly-Chaudière & Vervoort 1998) est un autre argument décisif conduisant à reconnaître l'existence d'une vaste catégorie cellulaire « neuro-sensorielle » (au sens large) recouvrant toute la diversité des types cellulaires sensoriels et nerveux rencontrés chez les eumétazoaires.

L'existence de ce continuum neuro-sensoriel n'est pas sans implications sur le plan évolutif. Elle suggère tout d'abord que les cellules sensorielles et nerveuses ont une origine commune, et que le type cellulaire ancestral dont dérive toutes les cellules neuro-sensorielles des eumétazoaires serait une cellule épithéliale ciliée pourvue d'un certain degré de sensibilité à des stimuli environnementaux. Cette idée est clairement sous-jacente à travers les tentatives récentes d'identifier chez les éponges des précurseurs évolutifs de cellules neurosensorielles. Deux types cellulaires épithéliaux de spongiaires ont été présentés comme des candidats pour être de tels précurseurs, dans la littérature récente :

- (i) les choanocytes, cellules pourvues d'un flagelle apical entouré d'une collerette de microvillosités. Certains auteurs suggèrent qu'ils pourraient être homologues aux cellules sensorielles des eumétazoaires, avec lesquelles ils présentent une certaine similitude structurale (notamment avec

les mécanorécepteurs). Il existe des arguments indirects en faveur d'une perception de type sensoriel par les choanocytes (Jacobs et al. 2007). Un autre argument avancé est l'expression restreinte aux choanocytes d'un gène à homéoboîte du type NK6/7 chez l'éponge *Oscarella* (Gazave et al. 2008).

(ii) les cellules globulaires (« globular cells ») présentes dans les épithéliums de nombreuses larves d'éponges (Renard et al. 2009, Ereskovsky 2010, Nickel 2010). Chez *Amphimedon queenslandica*, celles-ci expriment certains homologues de protéines post-synaptiques des Bilateria (Sakarya et al. 2007) ainsi que des gènes régulateurs impliqués dans la neurogenèse chez les Bilateria et les cnidaires (Richards et al. 2008) (voir plus loin, Fig. 45).

La théorie de la ségrégation de fonctions (Arendt 2008) représente un autre exemple d'interprétation du continuum neuro-sensoriel en terme de scénario évolutif. La logique générale de cette théorie est que les types cellulaires ancestraux étaient multifonctionnels et que l'évolution a consisté essentiellement en une spécialisation des fonctions dans des types cellulaires distincts. Selon cette vision des choses, une cellule à la fois neuronale et sensorielle ancestrale (étape 3 de la figure 46A) aurait précédé l'apparition de types cellulaires distincts sensoriels et neuronaux (étape 4 de la figure 46A).

Cette théorie postule également que plus anciennement encore, les fonctions réceptrices et effectrices étaient remplies par les mêmes cellules (étape 1 de la figure 46A), la séparation des effecteurs (p. ex. cellules musculaires), étant une étape plus dérivée (étape 2 de la figure 46A). L'existence chez les non Bilateria actuels de certains types cellulaires « récepteurs-effecteurs autonomes » est avancée comme un argument en faveur de cette théorie. Ainsi, par exemple, le cnidocyte des cnidaires peut dévaginer son filament-harpon (propriété effectrice) pour capturer une proie lorsque celle-ci entre en contact avec le cil sensoriel de la cellule (propriété réceptrice), et ce phénomène peut se produire sans intervention du système nerveux associé (Aerne et al. 1991)<sup>15</sup>. Les cellules ciliées (« polster cells ») des palettes natatoires des cténaires constituent vraisemblablement un autre exemple de récepteurs-effecteurs autonomes, car le battement de leurs cils est déclenché suite à la stimulation mécanique des peignes par le courant d'eau local provoqué par le battement de la palette voisine (cf. § 1.1.2.).

De tels scénarios évolutifs doivent néanmoins être pris avec précautions, car le continuum neuro-sensoriel peut aussi bien avoir résulté d'une évolution parallèle de types cellulaires dont la différenciation et le fonctionnement mettent en jeu des modules en partie communs. Nous verrons d'ailleurs plus loin que l'existence d'un autre continuum (entre transmission paracrine et synapse

---

<sup>15</sup> Toutefois, il est également connu que les cellules nerveuses liées aux cnidocytes par des synapses sont susceptibles d'activer ou d'inhiber la décharge des cnidocytes.

chimique) a servi de base à l'élaboration d'un scénario évolutif tout à fait différent n'impliquant pas une « origine commune » des neurones et des cellules sensorielles (Nickel 2010) (cf. plus loin § 3.1.3.-E).

### 3.1.3. Les cellules neuro-sensorielles (au s.l.) : un « bricolage de l'évolution »

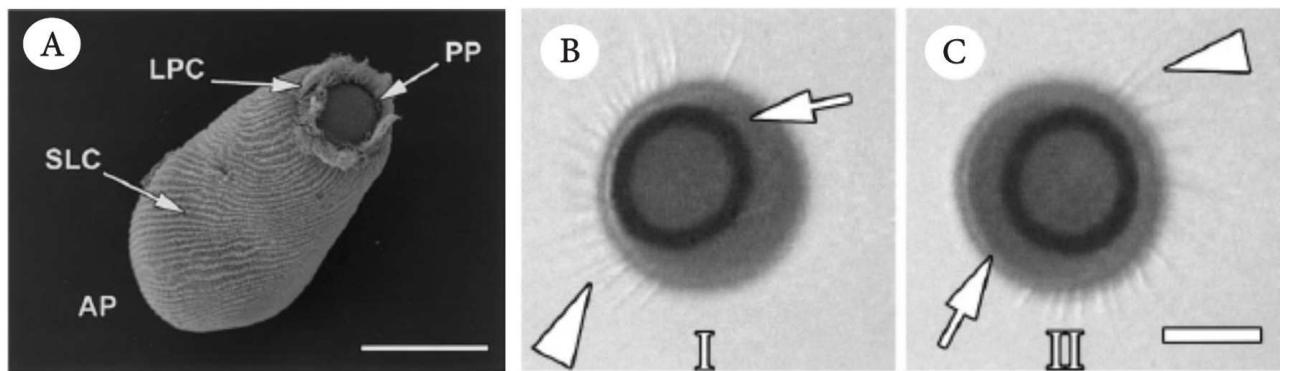
En philosophie aristotélicienne, les animaux sont définis par leurs capacités sensorielles et motrices. Aristote définit trois types d'âmes. L'âme végétative, dont tous les êtres vivants sont pourvus, permet de se nourrir et de se reproduire. L'âme sensitive, présente chez les animaux, leur confère les facultés de percevoir par les sens, ainsi que le désir, la douleur, et la mobilité. Enfin, l'âme intellective appartient exclusivement aux hommes, êtres rationnels (qui cumulent également les autres types d'âmes) et leur confère les facultés cognitives, la pensée, la mémoire, l'imagination. Ainsi, les notions de perception, de sensation, ainsi que celle de capacité à se mouvoir sont intimement liées à la définition classique de l'animal. Le système neuro-sensoriel étant précisément ce qui permet la perception et le contrôle de la motricité, il a naturellement été considéré traditionnellement comme une caractéristique essentielle des animaux.

Il est donc important de se pencher sur ce qui constitue l'essence du système neurosensoriel pour en décomposer les différentes caractéristiques fondamentales, telles que nous les avons résumées au § 3.1.1. Nous allons voir que malgré l'originalité évidente du système neuro-sensoriel (sans équivalent dans le monde vivant), son acquisition s'est accompagné d'un petit nombre d'innovations véritables. Chacune des caractéristiques fondamentales du système neurosensoriel fait intervenir des éléments (gènes régulateurs, canaux ioniques, mécanismes physico-chimiques) partagés par d'autres organismes vivants, extérieurs aux eumétazoaires voire aux métazoaires. Ces propriétés ou mécanismes ne sont donc pas l'apanage des eumétazoaires, et ont été co-optés pour construire la cellule neurosensorielle.

#### A - La perception de stimuli environnementaux

La perception de la lumière, de la gravité, de la température, de phéromones sont des facultés extrêmement répandues chez les organismes vivants, et sont loin d'être l'apanage des espèces pourvues d'un système nerveux. Par exemple, les éponges adultes perçoivent des stimuli (notamment mécaniques) qui déclenchent des réponses, la plus spectaculaire étant la contraction des orifices du système aquifère et/ou de l'ensemble du corps (Nickel 2010). Il existe par ailleurs chez de nombreuses éponges un rythme spontané de contractions qui est modifié par des stimuli extérieurs. Chez les éponges *Tethya wilhelma* (Nickel 2010) et *Ephydatia muelleri* (Elliott & Leys 2010), il a été montré

que ces contractions correspondent principalement à une variation de volume du système aquifère. Les larves d'éponges nagent dans la colonne d'eau et présentent des tropismes, notamment vis-à-vis de la lumière. Les travaux de Sally Leys et collaborateurs ont montré que l'anneau de cellules ciliées pigmentées qui se trouve au pôle postérieur de la larve d'*Amphimedon queenslandica* pourrait être impliqué dans ce comportement. Les cils de ces cellules se dressent lorsqu'ils sont exposés à la lumière (Fig. 40) (Leys & Degnan 2001). On peut donc légitimement suggérer que des cellules de type sensoriel sont présentes chez les éponges.<sup>16</sup>



**Figure 40.** Mouvement des cils de l'anneau pigmenté de la larve d'*Amphimedon queenslandica*. (A) Image au MEB d'une larve montrant les longs cils postérieurs (**LPC**), le pôle postérieur non cilié (**PP**) et les courts cils du reste du corps (**SLC**). (B-C) Photos extraites d'enregistrements vidéo de larves vivantes éclairées par la gauche (B) ou par la droite (C) (vues du pôle postérieur). Alors que la larve tourne en permanence sur elle-même comme une toupie, à chaque instant les cils qui sont du côté de la lumière sont dressés (tête de flèche), alors que ceux qui sont du côté opposé sont courbés et recouvrent le pôle postérieur (flèche). **AP** : pôle antérieur (vers l'avant lors de la nage). Barres d'échelle : (A) 250 µm, (B, C) 100 µm. D'après Leys & Degnan (2001).

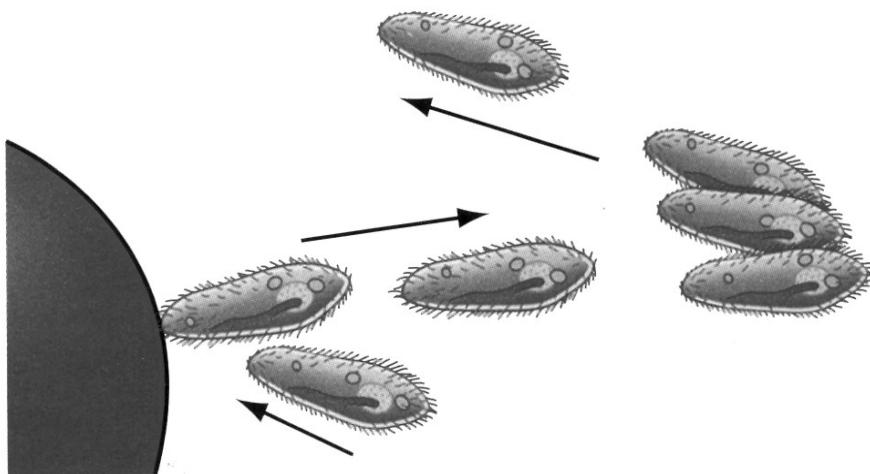
Les phénomènes de perception de stimuli environnementaux et de réponses comportementales sont légion chez les eucaryotes en dehors des métazoaires (ainsi que chez les « procaryotes »), et il n'est pas question ici d'en donner une présentation complète, mais seulement quelques exemples significatifs. Chez l'algue verte pluricellulaire *Volvox carteri*, Ebnet et al. (1999) ont montré qu'une rhodopsine homologue à celle des animaux est impliquée dans la photoréception. En fonction de l'éclairage, les cellules flagellées de l'algue modifient leur battement de telle sorte qu'elles vont et viennent entre la zone éclairée et la zone ombragée. Un rôle d'une rhodopsine dans la photoréception a également été montré chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas*.

Un autre exemple particulièrement édifiant est celui de la paramécie, eucaryote unicellulaire du groupe des ciliés qui a depuis longtemps fasciné les scientifiques par son comportement de nage. En effet,

---

<sup>16</sup> Néanmoins, ces cellules n'étant pas connectées à un système nerveux, l'emploi du concept de cellule sensorielle dans ce contexte pose problème.

lorsque la paramécie butte sur un obstacle, elle est capable d'inverser le battement de ses cils pour nager à reculons, puis de modifier son axe de déplacement avant de repartir en « marche avant » (Fig. 41). En revanche, si l'on stimule mécaniquement le pôle « postérieur » de la cellule, la fréquence de battement des cils augmente, induisant un comportement de fuite. La paramécie peut également détecter des variations chimiques de son milieu, et notamment des variations des ions sodium et magnésium (Greenspan 2007). La perception des stimuli mécaniques chez la paramécie met en jeu des canaux ioniques mécanosensibles localisés au niveau de la membrane plasmique des cils, de façon très similaire à ce qui se passe sur les cellules sensorielles mécanoréceptrices de métazoaires. Au pôle antérieur de la paramécie, l'ouverture de ces canaux mécanosensibles provoque un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  qui conduit à une dépolarisation de la membrane, analogue à un potentiel de récepteur.

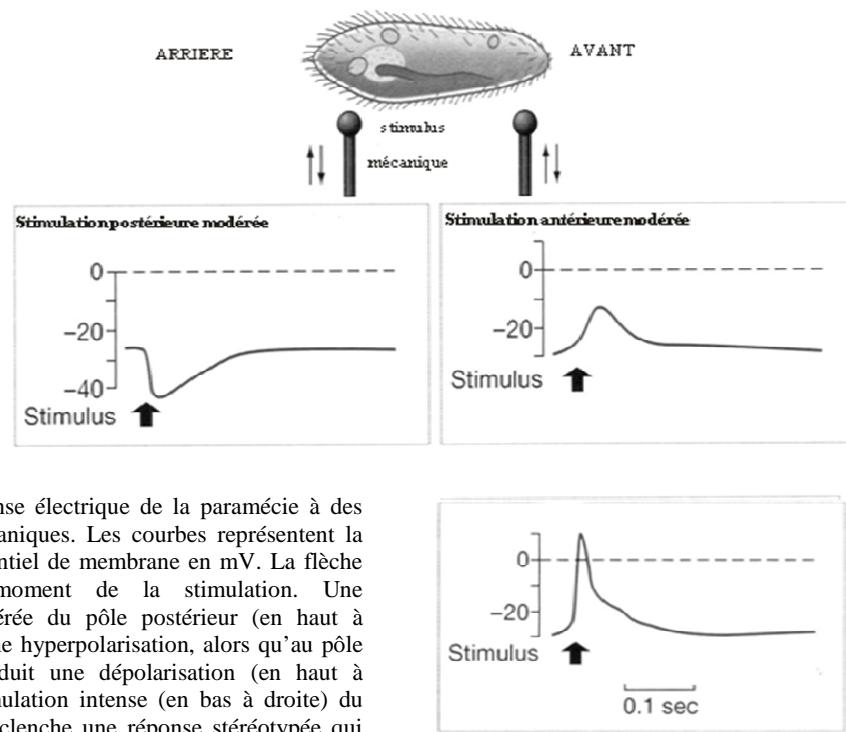


**Figure 41.** Comportement d'évitement chez *Paramecium*. Lorsque la paramécie butte sur un obstacle, le mouvement de ses cils s'inverse, elle nage alors à reculons, pivote, et nage à nouveau dans la direction initiale. *D'après Greenspan (2007)*.

## B - La formation et la conduction des potentiels d'action

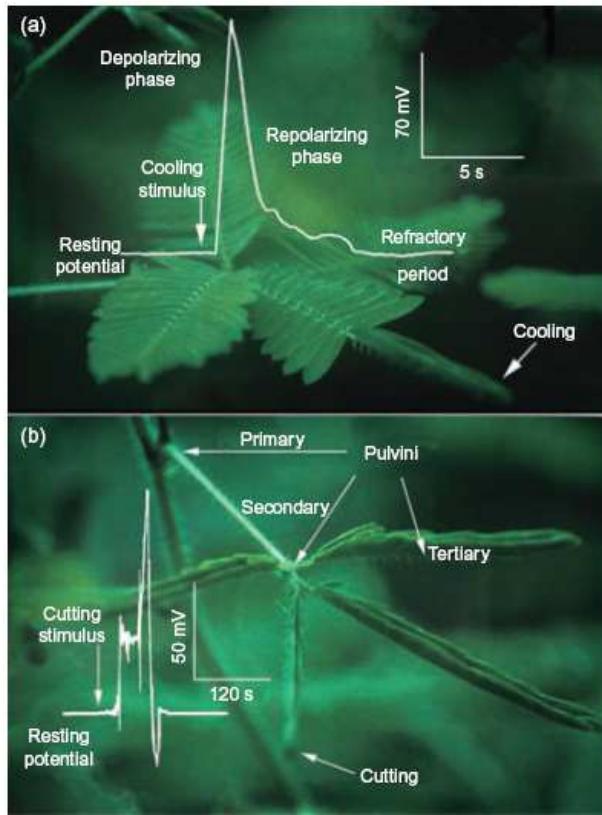
En dehors des eumétazoaires, un grand nombre d'eucaryotes sont capables de générer des potentiels d'action. En Mai 1969, Yutaka Naitoh et Roger Eckert ont l'idée de planter une électrode au milieu de la paramécie et de comparer les variations du potentiel de membrane après une stimulation du pôle antérieur et après une stimulation au pôle postérieur (Fig. 42). Dans le second cas, la stimulation entraîne une augmentation de la conductance pour l'ion  $\text{K}^+$  (qui sort alors de la cellule), et crée une hyperpolarisation de la membrane. Cette hyperpolarisation a un effet direct sur le rythme de battement des cils, provoquant leur accélération. En revanche, lorsque le pôle antérieur est stimulé, nous avons vu qu'est générée une dépolarisation semblable à un potentiel de récepteur. Lorsque ce potentiel de récepteur devient suffisamment positif, il déclenche la formation d'un second type de dépolarisation,

qui parcourt quasi-instantanément l'ensemble de la cellule : il s'agit d'un potentiel d'action, créé par l'ouverture de canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants (Fig. 42, en bas à droite). Au niveau des cils recouvrant la paramécie, ce potentiel d'action provoque une inversion du sens de battement ciliaire et la paramécie nage « à reculons ». Le calcium est ensuite pompé vers l'extérieur et la paramécie nage à nouveau en marche avant. Comme chez les métazoaires, le retour au potentiel de repos se fait grâce à l'entrée d'ion potassium.



**Figure 42.** Réponse électrique de la paramécie à des stimulations mécaniques. Les courbes représentent la variation du potentiel de membrane en mV. La flèche représente le moment de la stimulation. Une stimulation modérée du pôle postérieur (en haut à gauche) induit une hyperpolarisation, alors qu'au pôle antérieur elle induit une dépolarisation (en haut à droite). Une stimulation intense (en bas à droite) du pôle antérieur déclenche une réponse stéréotypée qui se propage sans décrémentation le long de la cellule : un potentiel d'action. *D'après Greenspan (2007).*

Toutes les plantes utilisent des signaux électriques pour réguler des fonctions physiologiques (Fromm & Lautner 2007). Dans certains cas, elles génèrent des potentiels électriques qui se déclenchent au delà d'un certain seuil de dépolarisation, selon un mode tout-ou-rien, et qui se propagent sans décrémentation à travers le phloème : il s'agit là encore de potentiels d'action. Chez la sensible (*Mimosa pudica*) par exemple, une stimulation thermique de la feuille conduit à la rétractation des folioles, comportement souvent interprété comme une protection contre les prédateurs herbivores. Le stimulus crée un potentiel d'action dont la phase de dépolarisation implique la sortie d'ion  $\text{Cl}^-$  (Fig. 43). Ce potentiel d'action assez lent (20 à 30 mm par seconde) est suivi d'une période réfractaire plus longue que chez les animaux. Chez la plupart des plantes, le retour au potentiel de repos se fait grâce à la sortie de potassium.

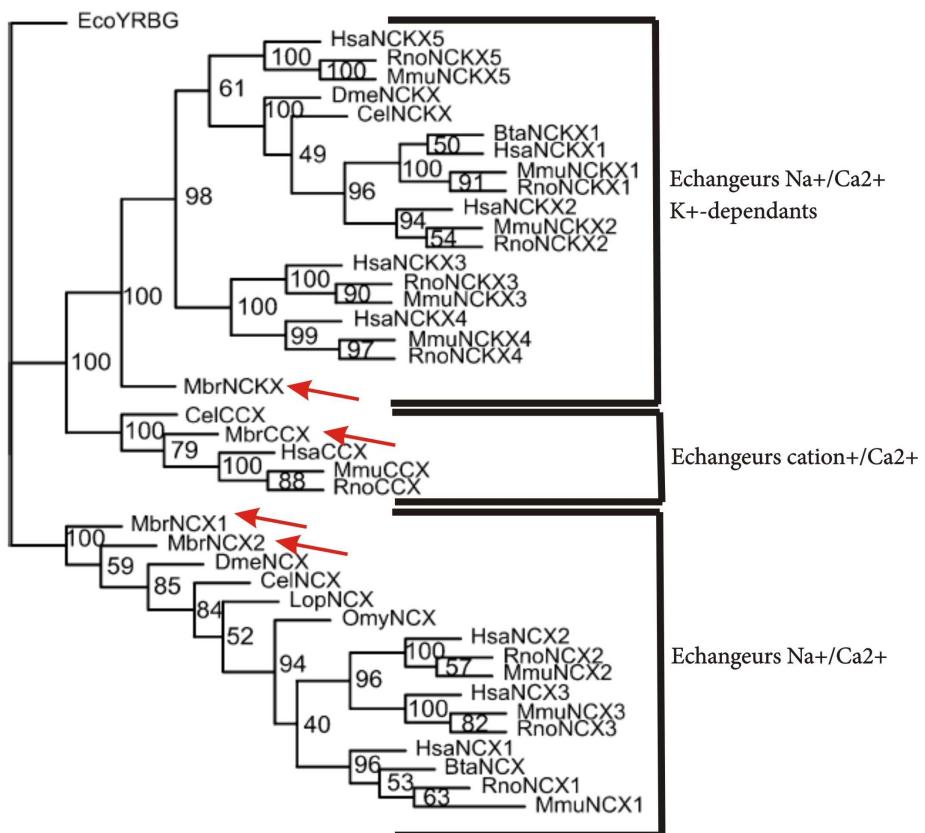


**Figure 43.** Signal électrique chez *Mimosa pudica*. (a) Quand l'extrémité d'une penne (division de premier ordre de la feuille) est stimulée avec de l'eau froide (**cooling**) ou par contact, un potentiel d'action est formé et se propage à une vitesse de 20-30 mm/s. A la base de chaque foliole, une structure renflée (pulvinus) répond alors par un influx d'ions et d'eau qui conduit à la rétractation du foliole. Ce signal s'arrête à la base de la penne et ne se propage pas aux autres pennes de la feuille. (b) Quand la feuille est stimulée en coupant un morceau d'une penne (**cutting**), un potentiel de variation est émis, plus lent que le potentiel d'action (5- 6 mm/s) et non autoentretenu. A la différence du potentiel d'action, ce potentiel de variation se propage aux autres pennes et jusqu'à la base du pétiole, conduisant à la rétractation de l'ensemble de la feuille. *D'après Fromm & Lautner (2007).*

Fromm et al. (1995) ont montré que la pollinisation de la fleur d'*Hibiscus* provoque une modification du potentiel de membrane transmise jusqu'à l'ovaire. Une série de 10 à 15 potentiels d'action cause une augmentation de la respiration ovarienne. Les auteurs font l'hypothèse que cette réponse physiologique pourrait préparer la fleur à adapter son métabolisme ovarien pour la fécondation. A l'inverse, une stimulation des stigmates par le froid cause un unique PA et une diminution de la respiration ovarienne.

Bien que présentant des différences dans les modalités de leur réalisation selon les groupes, des potentiels d'action sont donc utilisés par les organismes pour la communication électrique à travers l'ensemble de l'arbre des eucaryotes. La capacité des membranes à faire varier leur conductance en réponse à une stimulation extérieure met en jeu des canaux ioniques permettant de faire entrer ou sortir le calcium, le potassium, le sodium ou le chlorure. Les canaux ioniques sont qualifiés par Miller (2000) de « superb chemists » car ils sont non seulement capables de répondre à un stimulus de façon adaptée en s'ouvrant et se fermant très rapidement, mais il peuvent également faire une sélection parmi des ions inorganiques très similaires. De tels canaux ioniques sont présents aussi bien chez les « procaryotes » que chez les eucaryotes (Anderson & Greenberg 2001 ; Kloda & Martignac 2002). Mais les analyses phylogénétiques pour tester l'homologie des canaux à grande échelle sont rares.

Récemment une analyse basée sur le génome du choanoflagellé (groupe-frère des métazoaires) *Monosiga brevicollis* (Cai 2008) a montré que cet organisme unicellulaire possède des orthologues de tous les types de canaux calciques des métazoaires (une analyse phylogénétique des échangeurs calciques est donnée en exemple, Fig. 44). Dans l'article 2 de cette thèse, nous avons nous-mêmes établi que *Monosiga* possède des orthologues de la pompe calcique PCMA et du transporteur potassique Shaker (Alié & Manuel 2010).



**Figure 44.** Analyse phylogénétique des canaux échangeurs Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> des animaux et du choanoflagellé *Monosiga brevicollis*. L'orthologie des séquences de choanoflagellé avec les différents types de canaux des métazoaires est soutenue par des indices de bootstraps maximaux. Analyse en Maximum de Vraisemblance. **Bta** : *Bos taurus* ; **Cel** : *Ceaeorhabditis elegans* ; **Dme** : *Drosophila melanogaster* ; **Eco** : *Escherichia coli* ; **Hsa** : *Homo sapiens* ; **Lop** : *Loligo opalescens* ; **Mbr** : *Monosiga brevicollis* ; **Mmu** : *Mus musculus* ; **Omy** : *Oncorhynchus mykiss* ; **Rno** : *Rattus norvegicus*. D'après Cai (2008).

## C – Intermède. Les « innovations-clés » des eumétazoaires sous-tendant l’acquisition du système neuro-sensoriel

Nous venons de montrer que la capacité de percevoir des stimuli environnementaux et celle de générer et de transmettre des influx électriques (en particulier, des potentiels d'action) ne sont pas des innovations liées à l'acquisition du système neuro-sensoriel. Mais alors quelles sont les innovations-clés qui ont sous-tendu l'élaboration de ce système et qui lui confèrent son originalité ? L'identification des innovations implique une comparaison avec les groupes externes (en l'occurrence spongiaires, placozoaires, et non-métazoaires). De plus, il est évident que la réponse à cette question dépend du niveau d'intégration biologique auquel on se place. A l'échelle cellulaire, les principales innovation-clés sous-tendant l'acquisition du système neuro-sensoriel semblent être :

### - *L'invention du type cellulaire neuro-sensoriel*

Dans les exemples vus précédemment, chez les plantes et *a fortiori* chez les unicellulaires, la transmission de l'influx électrique dans l'organisme est assurée par des cellules dont ce n'est pas l'unique fonction (par exemple le phloème des plantes sert surtout au transport de la sève brute). L'originalité de l'apparition du système neuro-sensoriel chez les eumétazoaires réside donc dans le fait qu'un type cellulaire particulier est spécialement dévolu aux fonctions de perception des stimuli environnementaux et/ou de communication nerveuse : la cellule neuro-sensorielle (dans le sens large tel qu'il a été défini dans la partie 3.1.2.). Nous sommes donc ici dans une problématique liée à la différenciation cellulaire, et pour analyser plus en détail en quoi consiste cette « innovation » il faut s'intéresser, dans un cadre évolutif, aux gènes impliqués dans la spécification et la différenciation des cellules neuro-sensorielles.

### - *L'invention des neurites*

Au niveau cytologique, le seul caractère propre aux cellules neuro-sensorielles et absent en dehors des eumétazoaires semble être le neurite. Il s'agit plus précisément d'un caractère cytologique neuronal, car le neurite est absent dans les cellules sensorielles « sensu stricto ». Le neurite joue un rôle essentiel au sein du système nerveux car il permet à la fois la directionalité et la rapidité de la conduction de l'information. Ce qui justifie de qualifier le neurite d'innovation des eumétazoaires, c'est son absence chez les placozoaires et chez les spongiaires<sup>17</sup>.

---

<sup>17</sup> Dans le passé, il a été décrit des « cellules nerveuses » chez certaines éponges. Il s'agit de cellules du mésohyle présentant une certaine ressemblance morphologique avec des neurones, car elles sont munies de fins prolongements qui, parfois, paraissent établir des contacts (voir p. ex. Pavans de Ceccatty 1959, 1960). Toutefois, il est actuellement établi que ces contacts ne sont pas permanents et le consensus chez les spongiologues est que ces cellules n'ont rien à voir avec des neurones (voir discussion dans Nickel 2010).

L'émergence du neurite au cours de l'évolution est actuellement mal comprise. Pour aborder ce problème, il faudrait par exemple s'intéresser aux spécificités du cytosquelette des neurites (origine des neurofilaments, etc.), ce qui implique notamment d'explorer l'hypothèse d'une éventuelle homologie du neurite avec le cil ; il faudrait également comparer, entre Bilateria et cnidaires / cténaires, les mécanismes de transport (notamment de vésicules) le long des neurites, de croissance et de guidage (p. ex., les mécanismes de guidage axonal caractérisés chez les Bilateria étaient-ils en place chez l'ancêtre des eumétazoaires ?).

#### *- L'invention des synapses*

Le pluriel est ici important car les deux types de synapses, électrique et chimique, sont radicalement différents du point de vue structural et fonctionnel (p.ex. au niveau de la synapse chimique, le ralentissement de l'influx nerveux est important, ce qui n'est pas le cas au niveau de la synapse électrique). Les deux types de synapses sont clairement des innovations des eumétazoaires car aucune structure comparable n'a jamais été observée chez les placozoaires et les spongiaires. Les synapses électriques (jonctions de type gap) sont constitué de protéines de la famille des connexines, qui sont une innovation des eumétazoaires (Shestopalov & Panchin 2009).

La synapse n'est pas propre au type cellulaire neuro-sensoriel (encore moins, neuronal) car une synapse implique toujours deux cellules, qui suivant les cas peuvent être deux cellules de type neuro-sensoriel, ou l'une de type neuro-sensoriel et l'autre d'un autre type (p. ex., cellule musculaire, cellule glandulaire...), ou même deux cellules de type non neuro-sensoriel (p.ex. couplage de cellules musculaires par des synapses électriques, dans la sous-ombrelle des hydroméduses, ou dans le muscle cardiaque des vertébrés). La synapse est plutôt à concevoir comme l'élément-clé de la communication inter-cellulaire au sein du système neuro-sensoriel. Certains la considèrent comme la seule innovation-clé liée à l'acquisition du système neuro-sensoriel (Nickel 2010).

Nous allons maintenant nous pencher plus en détail sur deux de ces « innovation-clés », le type cellulaire neuro-sensoriel et la synapse chimique, pour constater qu'à l'échelle génétique et moléculaire, leur mise en place au cours de l'évolution a largement consisté à co-opter des composants (gènes régulateurs, protéines structurales etc.) d'origine plus ancienne que les eumétazoaires.

## D - La signature moléculaire de la cellule neurosensorielle : co-option et innovation génétique

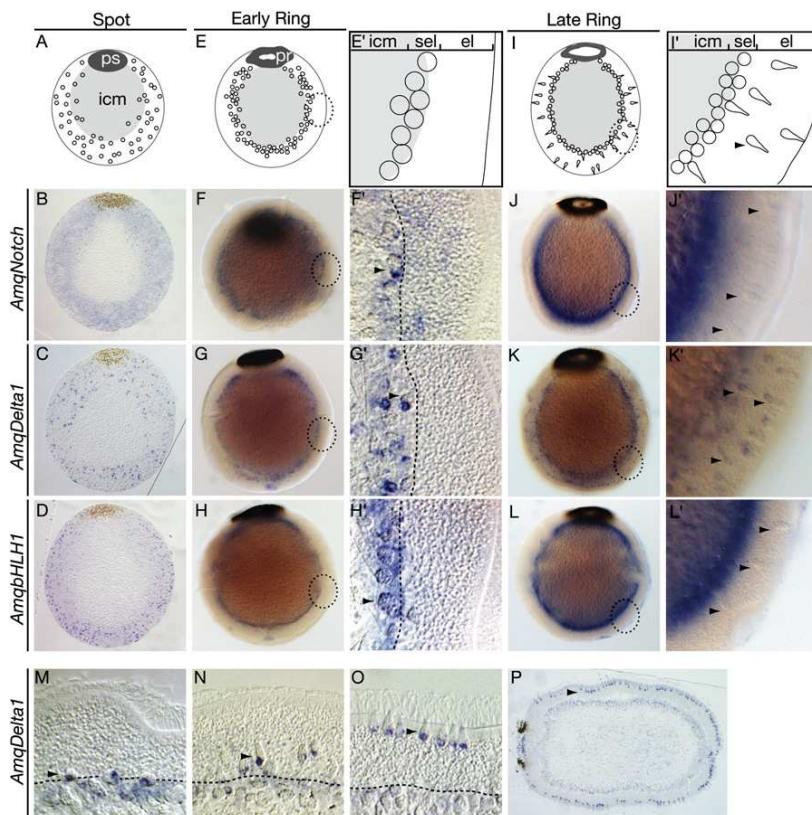
Un certain nombre de molécules régulatrices impliquées dans la neurogenèse des Bilateria sont exprimées chez les cnidaires au cours de la formation des cellules nerveuses et / ou des cnidocytes (qui sont un type particulier de cellule neuro-sensorielle mécanoréceptrice). On trouvera un catalogue complet des données (expression et fonction) sur les gènes dont l'implication dans les mécanismes neurogéniques est conservée entre cnidaires et Bilateria, dans les revues bibliographiques de Galliot et al. (2009) et Watanabe et al. (2009). Parmi ces gènes, on peut citer par *Cnox2/Gsx* (gène à homéoboîte de la classe ANTP, famille Para-Hox), *msx* (gène à homéoboîte de la classe ANTP, groupe NKL), *prdla* et *prdlb* (gènes à homeobox de la classe PAIRED), *CnASH* (gène à bHLH de type Achaete-scute), *Zic* (facteur de transcription à doigt de zinc), *COUP-TF*, *Notch*, etc. (références aux travaux originaux dans les deux revues citées plus haut). Dans le cas des facteurs de transcription SOX, les travaux réalisés dans l'équipe aussi bien chez le cténaire *Pleurobrachia pileus* (Jager et al. 2008) que chez le cnidaire *Clytia hemisphaerica* (Jager et al. In prep.) indiquent que parmi les membres de cette famille, ceux qui sont exprimés dans des cellules différenciées ou en cours de différenciation le sont très majoritairement dans des cellules de type neuro-sensoriel au sens large (sauf dans le cas des gènes SoxF, liés à l'endoderme)<sup>18</sup>. Ces données suggèrent qu'une grande partie du programme lié au destin et à la différentiation neuronale remonte à l'ancêtre commun des eumétazoaires, l'ensemble de ces gènes formant donc en quelque sorte une « boîte à outils moléculaires » régulatrice ancestrale des cellules neuro-sensorielles.

Le séquençage du génome de l'éponge *Amphimedon queenslandica* a révélé la présence d'homologues de beaucoup de ces « gènes neuraux ». Par exemple, on trouve dans le génome de l'éponge des gènes à bHLH (Simionato et al. 2007, Richards et al. 2008), des facteurs de transcription Sox, Fox, T-box, Paired et POU (Larroux et al. 2008 ; Jager et al. 2006) ainsi que LIM (Larroux et al. 2008, Srivastava et al. 2010). La voie Notch est également présente chez les éponges (Nichols et al. 2006, Richards et al. 2008, Gazave et al. 2009). Ces familles de gènes sont très généralement présentes aussi dans le génome du placozoaire *Trichoplax adhaerens* (Srivastava et al. 2008). Il y a aussi des cas d'homologues de « gènes neuraux » présents dans le génome du placozoaire et absent du génome de l'éponge, p. ex. le gène ParaHox Gsx (= Cnox2 chez les cnidaires), impliqué dans la spécification des précurseurs communs de neurones et de cnidocytes chez l'hydre (Miljkovic-Licina et al. 2007) et exprimés dans des cellules nerveuses putatives du bulbe tentaculaire de *Clytia* (Chiori et al. 2009).

---

<sup>18</sup> Par contre, chez *P. pileus* comme *C. hemisphaerica*, d'autres facteurs Sox semblent plutôt associés aux cellules souches (y compris celles dont les dérivés ne sont pas neuro-sensoriels, Jager et al. 2008).

Par conséquent, il apparaît que l'essentiel des familles de gènes régulateurs liés à la différenciation du type neuro-sensoriel chez les eumétazoaires étaient déjà en place chez l'ancêtre des métazoaires, en l'absence de système nerveux. Il semble y avoir quelques rares exceptions, comme dans le cas des familles Otx (gènes à homéoboîte de la classe PAIRED) et Gsx (cf. plus haut) apparemment absentes chez les éponges (Galliot et al. 2009). De manière générale, l'innovation génétique dans la branche des eumétazoaires semble plutôt avoir consisté en une diversification de familles de gènes pré-existantes qui ont été recrutées dans le cadre de la régulation des cellules neuro-sensorielles (Galliot et al. 2009). Par exemple, l'analyse des gènes à bHLH révèle l'existence d'un gène unique chez l'ancêtre commun de l'éponge et des eumétazoaires, et de nombreuses duplications dans la branche des eumétazoaires (Richards et al. 2008). Il s'agit là d'ailleurs d'une tendance générale pour beaucoup de familles de gènes régulateurs (Galliot et al. 2009, Srivastava et al. 2010) et qui n'est certainement pas liée uniquement à l'acquisition du système neuro-sensoriel. En tout cas, on voit bien qu'au niveau génétique, l'acquisition de la cellule neuro-sensorielle a impliqué un mélange de co-options (de certaines familles de gènes régulateurs) et d'innovations génétiques (diversifications au sein de ces familles).



**Figure 45.** Expression des gènes *Notch*, *Delta1* et *bHLH1* dans la larve d'*Amphimedon queenslandica*. Les images (**F-H**) et (**J-L'**) montrent les HIS *in toto*, les images (**B-D**), (**F'-H'**) et (**M-P**) sont des coupes. La ligne du haut comporte des schémas des stades de développement de la larve. Au stade *spot*, tous les gènes sont exprimés dans les tissus superficiels, alors qu'au stade *early ring*, ils sont exprimés en position subépithéliale, dans des cellules interprétées comme des précurseurs de cellules globulaires. Au stade *late ring*, les cellules globulaires en migration expriment *Delta1*. **ps** : zone pigmentaire, **pr** : anneau pigmenté, **icm** : inner cell mass, **sel** : subepithelial layer, **el** : epithelial layer. D'après Richards et al (2008).

Enfin, l'expression, dans les cellules globulaires de l'épithélium de la larve de l'éponge *Amphimedon queenslandica* d'un programme de type proneural (ligand et récepteur de la voie Notch, et un gène de la famille des bHLH) (Richards et al. 2008) (Fig. 45) laisse envisager que l'association d'un réseau de gènes régulateurs particuliers à un type cellulaire particulier (« proto-neuro-sensoriel ») pourrait même avoir eu lieu dès l'ancêtre des métazoaires. Cette hypothèse reste peu étayée, car elle repose sur l'analyse d'un petit nombre de gènes, sur une seule espèce d'éponge, et de plus il manque des preuves expérimentales à l'appui d'une fonction de type sensoriel pour ces « cellules globulaires ».<sup>19</sup> Si cette hypothèse venait à se confirmer, elle remettrait en question l'idée même selon laquelle le type cellulaire neuro-sensoriel avec son réseau particulier de gènes régulateurs représente une innovation s'étant produite dans la branche des eumétazoaires.

## E- La synapse chimique, une zone de communication paracrine spécialisée

La synapse chimique est une structure complexe au sein de laquelle se réalise la conversion du message électrique pré-synaptique en un message chimique à travers la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Il existe une grande diversité de synapses chimiques du point de vue de la nature du neurotransmetteur (p.ex. acétylcholine, monoamines comme la sérotonine, la dopamine etc., acides aminés comme le glutamate et le GABA, neuropeptides comme les FMRFamides...).

La recherche des homologues des composants de la synapse chimique et l'élucidation de leurs fonctions chez les métazoaires sans système nerveux (placozoaires, et surtout éponges) représente une voie de recherche particulièrement prometteuse pour l'avenir. Car malgré son originalité apparente, la synapse chimique est formée de composants qui pour beaucoup ont précédé l'acquisition du système nerveux, même si certains éléments moléculaires impliqués dans sa structure et son fonctionnement représentent tout de même des innovations des eumétazoaires. Par exemple, la recherche des orthologues des protéines de la densité post-synaptique en dehors des eumétazoaires a fait l'objet d'une étude (Sakarya et al. 2007) qui a montré que beaucoup de ces protéines sont présentes dans le génome de l'éponge *Amphimedon*, et que certaines sont co-exprimées dans les cellules globulaires de la larve.

De plus, on sait que les éponges possèdent pour l'essentiel les différents systèmes de transmission mis en jeu dans le cadre des synapses chimiques des eumétazoaires. Ainsi, divers composants moléculaires

---

<sup>19</sup> Les cellules de la larve d'*Amphimedon* pour lesquelles une fonction liée à la perception de stimuli est le mieux étayé, c'est-à-dire les cellules photoréceptrices de l'anneau postérieur (Leys & Degnan 2001) (Fig. 40), ne semblent quant à elles pas exprimer cette combinatoire de « gènes neuraux » (Richards et al. 2008).

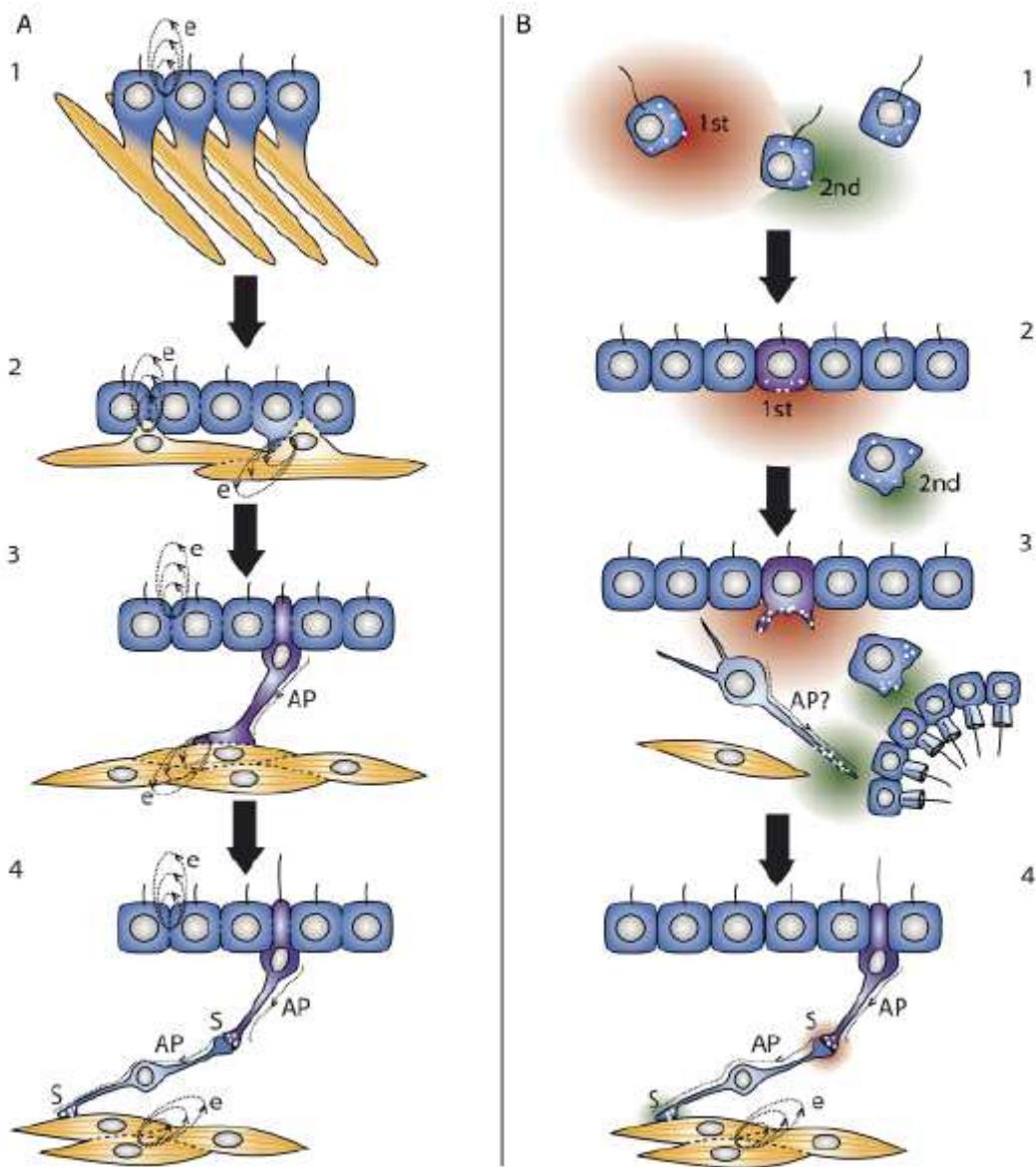
(ligands, récepteurs, enzymes...) liés à la transmission à l'acétylcholine, au glutamate, au GABA, aux monoamines et à l'oxyde nitrique (NO) ont été mis en évidence chez les éponges, et de nombreuses données expérimentales montrent que l'application de ce type de substances provoque des réactions spécifiques et quantifiables (Elliott & Leys 2001 ; revues dans Renard et al. 2009, Nickel 2010). D'ailleurs, la majeure partie de ces systèmes de transmission paraît même avoir une origine plus ancienne que les métazoaires (voir partie 3.3. en ce qui concerne la transmission cholinergique).

Partant de ces constatations, Nickel (2010) a récemment formulé une hypothèse particulièrement séduisante. Selon lui, il existerait un continuum évolutif biochimique et physiologique entre la transmission paracrine chez les organismes dépourvus de système nerveux (unicellulaires, éponges) et la transmission synaptique « typique » chez les eumétazoaires. L'évolution de la synapse correspondrait essentiellement à un phénomène de compartimentation, avec concentration de la machinerie sécrétrice vers les extrémités de prolongements cellulaires, et réduction de la distance donc du temps de diffusion des messagers extra-cellulaires grâce au rapprochement des membranes des deux cellules en communication. Cette restriction spatiale de la transmission paracrine aurait aussi permis d'éviter les effets autocrines, d'augmenter la finesse du signal (en évitant la dilution et la diffusion du signal autour de la cellule émettrice), et de donner à la transmission une directionnalité.<sup>20</sup> Un argument fort en faveur de l'existence de ce continuum est le fait que chez les Bilateria, la sécrétion de messagers extra-cellulaires par les neurones est loin de se limiter au contexte synaptique. La sécrétion neuronale peut donner lieu à une transmission paracrine agissant à quelque distance du neurone. On parle alors de neuromodulation, et certains messagers comme la sérotonine peuvent être suivant les cas utilisés comme neurotransmetteurs dans des synapses ou comme neuromodulateurs (De-Miguel & Trueta 2005). De plus, il est bien connu que certains neurones produisent des hormones, messagers à longue distance (sécrétion neuro-endocrinienne, p. ex. au niveau de la neurohypophyse chez les vertébrés).

Le scénario proposé par Nickel (2010) à propos de l'origine des cellules nerveuses (Fig. 46B) est bien différent du scénario de ségrégation de fonctions esquissé plus haut (fin du § 3.1.2.) (Fig. 46A). En effet, le scénario de Nickel n'implique pas d'« origine commune » au sens généalogique entre le type cellulaire « neurone » et d'autres types cellulaires (cellules sensorielles, cellules musculaires...).

---

<sup>20</sup> Cette dernière fonctionnalité correspond aux synapses chimiques directionnelles (qui ne transmettent l'influx que dans un sens déterminé), cas général chez les Bilateria. En revanche, chez les cnidaires et les cténaires, on rencontre de nombreuses synapses chimiques bidirectionnelles (pas de spécialisation entre une face présynaptique et une face postsynaptique, la synapse peut fonctionner dans les deux sens).



**Figure 46.** Comparaison de deux scénarios proposés pour l'évolution du système nerveux. (A) Hypothèse neuro-musculaire de ségrégation de fonctions (Arendt 2008, repris de Mackie 1970, lui-même s'inspirant de Parker 1919). (1) Cellule cumulant les fonctions épithéliale, sensorielle et musculaire. (2) Les myocytes primitifs commencent à se séparer de l'épithélium en s'internalisant. (3) Des protoneurones sensoriels se mettent en place et conduisent l'excitation depuis l'extérieur vers les myocytes par des potentiels d'action (AP = potentiel d'action). NB : jusqu'à cette étape toutes les cellules sont couplées électriquement. (4) Ségrégation entre neurone et cellule sensorielle, les deux étant capables de produire un PA. Elles sont connectées entre elles et aux myocytes par des synapses. Le couplage électrique persiste dans certaines cellules épithéliales et dans les muscles. (B) « Paracrine-to-electrochemical dominance transition hypothesis » proposée par Nickel 2010, inspiré de Grundfest (1959). (1) Communication paracrine chez les eucaryotes unicellulaires. (2) Communication paracrine intracorporelle hypothétique chez un métazoaire primitif (« early Metazoa » dans le texte de Nickel 2010) : une cellule épithéliale excitée émet un signal paracrine de premier ordre, relayé par une cellule mésenchymateuse émettant un signal de second ordre de même nature (relai) ou de nature différente (intégration) que le signal de premier ordre. (3) Apparition de nouveaux types cellulaires, dont certains avec une polarité et/ou des prolongements, aux extrémités desquels se concentre la communication paracrine. Eventuellement ces cellules peuvent produire des potentiels d'action. (4) Les cellules polarisées avec une communication paracrine compartimentée évoluent en neurone et en neurone sensoriel avec concentration de la sécrétion des messagers au niveau des synapses. Le PA joue maintenant un rôle prépondérant pour la communication à longue distance, alors que la communication paracrine est utilisée sur la courte distance : c'est la *Paracrine-to-electrochemical dominance transition*. AP : potentiel d'action, e : couplage électrique, S : synapse, 1st : message chimique de premier ordre, 2nd : message chimique de second ordre. *Figure d'après Nickel (2010).*

L'évolution du système nerveux aurait consisté fondamentalement dans l'élaboration de modules subcellulaires tels que ceux impliqués dans la formation des neurites, des synapses, etc., permettant d'augmenter la compartimentation de la transmission paracrine. On peut supposer que ce type de modules puisse être déployé de différentes manières dans différents types cellulaires, et ces derniers évoluer de façon parallèle en partageant tel ou tel aspect de leurs éléments de différenciation. L'auteur prévoit qu'on devrait trouver chez les éponges les étapes intermédiaires postulées par le scénario (p. ex. étape 3 de la Fig. 46B : transmission paracrine partiellement localisée à l'extrémité d'une cellule allongée). Pour tester ces hypothèses, il faudra aller au-delà de la génomique et progresser dans la mise au point des modèles expérimentaux et des techniques d'analyse fonctionnelle chez les éponges, à l'échelle cellulaire.

### **3.1.4. Objectifs du travail présenté dans les Articles 2 et 3**

La recherche des co-options et des innovations en lien avec l'évolution de la transmission synaptique constitue le thème commun des deux articles de recherche présentés dans la suite de cette partie. Le premier, publié début 2010 dans le journal *BMC Evolutionary Biology*, s'intéresse à l'origine des protéines constituant la densité post-synaptique dans les neurones de Bilateria. Nos analyses indiquent que les protéines de la densité post-synaptique ont émergé en deux grandes étapes, la première dans la branche commune des choanoflagellés et des métazoaires, donc dans un contexte unicellulaire, la seconde dans la branche commune des métazoaires, donc également avant l'origine du système nerveux et de la synapse. Certains composants (peu nombreux, mais importants vis-à-vis de la transmission synaptique) représentent des innovations des eumétazoaires (les séquences de *Pleurobrachia* n'ont pas été incluses dans cette étude qui se base uniquement sur des génomes complets, pour tester l'absence ou la présence des gènes). Le second article, encore en préparation et présenté dans une version préliminaire en français, s'intéresse à la transmission cholinergique et plus particulièrement à l'un de ses acteurs connus chez les animaux Bilateria, le transporteur à haute affinité de la choline CHT. Nous montrons que ce transporteur représente une innovation des eumétazoaires (alors que la transmission cholinergique a une origine beaucoup plus ancienne). L'étude de l'expression des deux paralogues de CHT identifiés chez le cténaire *Pleurobrachia pileus* suggère que chez le dernier ancêtre commun des eumétazoaires, ce transporteur était impliqué dans la transmission cholinergique neurale aussi bien que non neurale, et donc n'a pas été à l'origine spécifiquement associé au contexte synaptique.

**3.2 Article 2 : “The backbone of the post-synaptic density originated in a unicellular ancestor of choanoflagellates and metazoans”**

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# The backbone of the post-synaptic density originated in a unicellular ancestor of choanoflagellates and metazoans

Alexandre Alié, Michaël Manuel\*

## Abstract

**Background:** Comparative genomics of the early diverging metazoan lineages and of their unicellular sister-groups opens new window to reconstructing the genetic changes which preceded or accompanied the evolution of multicellular body plans. A recent analysis found that the genome of the nerve-less sponges encodes the homologues of most vertebrate post-synaptic proteins. In vertebrate excitatory synapses, these proteins assemble to form the post-synaptic density, a complex molecular platform linking membrane receptors, components of their signalling pathways, and the cytoskeleton. Newly available genomes from *Monosiga brevicollis* (a member of Choanoflagellata, the closest unicellular relatives of animals) and *Trichoplax adhaerens* (a member of Placozoa: besides sponges, the only nerve-less metazoans) offer an opportunity to refine our understanding of post-synaptic protein evolution.

**Results:** Searches for orthologous proteins and reconstruction of gene gains/losses based on the taxon phylogeny indicate that post-synaptic proteins originated in two main steps. The backbone scaffold proteins (Shank, Homer, DLG) and some of their partners were acquired in a unicellular ancestor of choanoflagellates and metazoans. A substantial additional set appeared in an exclusive ancestor of the Metazoa. The placozoan genome contains most post-synaptic genes but lacks some of them. Notably, the master-scaffold protein Shank might have been lost secondarily in the placozoan lineage.

**Conclusions:** The time of origination of most post-synaptic proteins was not concomitant with the acquisition of synapses or neural-like cells. The backbone of the scaffold emerged in a unicellular context and was probably not involved in cell-cell communication. Based on the reconstructed protein composition and potential interactions, its ancestral function could have been to link calcium signalling and cytoskeleton regulation. The complex later became integrated into the evolving synapse through the addition of novel functionalities.

## Background

Many of the complex traits that distinguish the organisation and biology of multicellular animals originated during the early phase of their evolutionary history. Among these, the emergence of the neuro-sensory system represents a particularly fascinating conundrum, because the biological support of animal perception and behaviour is extraordinarily complex at the molecular, cellular and anatomical scales, and without equivalent in the living world. A promising path to understanding the

genetic changes that shaped the body plan of multicellular animals has been recently opened by comparative analyses of genomes from the early-diverging animal lineages and the closest unicellular relatives of metazoans (e.g. [1-10]).

The recent characterisation of a nearly complete set of post-synaptic protein orthologues in the genome of the sponge *Amphimedon queenslandica* [2] represents a successful illustration of this approach. Excitatory synapses in the vertebrate central nervous system are characterised by an electron-dense structure called the post-synaptic density (PSD) below the post-synaptic membrane. Proteomic investigations have identified about one thousand proteins in this complex [11-14]. Some of

\* Correspondence: Michael.Manuel@snv.jussieu.fr  
UPMC Univ Paris 06, UMR 7138 Systématique, Adaptation, Evolution CNRS  
IRD MNHN, Bâtiment A, 4ème étage, Case 05, Université Pierre et Marie Curie, 7 quai St Bernard, 75 005 Paris, France

these proteins (e.g. Shank, DLG, Homer, GRIP) have pivotal roles in building a scaffold for the anchorage of the other PSD components, for instance membrane receptors for neurotransmitters, cation channels, members of intracellular signalling pathways, and cytoskeleton or cytoskeleton regulation proteins [15-18]. This complex sub-membrane platform thereby connects cell surface receptors with components of signal transduction pathways and with the cytoskeleton machinery. The PSD is also involved in synaptogenesis, dendritic spine formation and synaptic plasticity [17,19,20]. The three-dimensional architecture of the PSD is determined by multiple protein-protein interactions through binding domains (e.g. [17,18,21]). For example, the vertebrate Shank protein, the master scaffold protein of the PSD [18], contains five interacting domains (from N-ter to C-ter: ankyrin repeats, SH3 domain, PDZ domain, proline-rich region, SAM domain) involved in a huge variety of homomeric and heteromeric interactions. Among PSD scaffold proteins, PDZ (for Post-synaptic density protein 95/Drosophila disc large tumor suppressor/Zo-1) is the most common type of binding domain, with many proteins containing multiple PDZ domains (e.g. three in the DLG protein; seven in GRIP).

Not only were most PSD proteins identified in the sponge genome (whereas most are absent in fungal or plant genomes), but moreover these proteins essentially contain the same interacting domains arranged into the same architectures as in their vertebrate counterparts [2]. Intriguingly, several of the sponge PSD-like genes (*DLG*, *GKAP*, *GRIP*, *HOMER*, *CRIP*) were found co-expressed in a particular non-ciliated epidermal cell type of the *Amphimedon* larva, the globular cell (erroneously called "flask cells" in [2], see [22]). These observations are consistent with the existence in sponges of an assembled structure similar to the vertebrate PSD, despite absence of recognisable nerve cells and synapses.

The PSD protein complex would therefore have originated before the acquisition of synapses in a nerve-less ancestor, at least under the conventional view that sponges branched off earlier than animals with a nervous system in the phylogeny (e.g. [23-27]). Moreover, since the sponge globular cells express Notch/Delta homologues and a proneural-like bHLH transcription factor [22] in addition to PSD genes, they might represent putative sensory "proto-neural" cells responding to environmental stimuli [22] and a possible "starting point" for the evolution of neural cells [2]. Some recent molecular phylogenies [28-31] have pointed to more complicated evolutionary scenarios (e.g. secondary loss of nerve cells and synapses in sponges) by challenging the monophyly of animals with a nervous system (Cnidaria, Ctenophora and Bilateria, classically grouped under the Eumetazoa) and the early divergence of

sponges (discussed in [32,33]). However, a recent phylogenomic study with increased species sampling of non-bilaterian lineages and sophisticated model of sequence evolution [34] lent support to the conventional phylogeny and thereby to a single acquisition of nerve cells and synapses in a eumetazoan ancestor.

Since the publication of [2], additional annotated complete genomes have become available. The present study aims at improving our understanding of the emergence of the PSD protein complex by focusing on sequence data from *Monosiga brevicollis* and *Trichoplax adhaerens*, two organisms of particular interest with respect to early metazoan evolution. *Monosiga* is a member of choanoflagellates, the unicellular sister-group of the Metazoa [1,8]. Previous studies have suggested (without rigorous analyses) the existence of some PSD protein orthologues in the *Monosiga* genome [2], but these have been considered "very few" [10], supporting the idea that the PSD scaffold is essentially an innovation of the metazoan lineage. However, this remains to be tested rigorously through systematic analyses of choanoflagellate orthologues of the post-synaptic genes. *Trichoplax* (phylum Placozoa) is a nerve-less animal whose flat and asymmetric body comprises two epithelial cell layers enclosing a loose formation of interconnected fibre cells sandwiched in between [35]. The phylogenetic placement of placozoans remains highly contentious (e.g. [28,34,36]). Analyses of the *Trichoplax* genome have revealed a degree of genetic complexity that was totally unexpected given its morpho-anatomical simplicity [36]. As the only non-sponge animal lacking a nervous system, *Trichoplax* is clearly of pivotal importance for understanding the origin of neural cells and synapses.

The gene set investigated in the present study comprises the main scaffold proteins of the PSD, and their more significant interacting partners as recognised in the recent literature (e.g. [15-18]). It is essentially the gene set analysed in [2]. Similarity searches for PSD proteins were conducted against the genomes of *M. brevicollis*, *T. adhaerens*, several non-metazoan eukaryotes (as outgroups) and a representative sampling of metazoan species. Our analyses provide evidence for the presence of a substantial subset of functionally important scaffold PSD proteins in the common ancestor of choanoflagellates and metazoans, and for secondary loss of the master scaffold protein Shank in placozoans.

## Methods

### Data collection

The protein set examined in this study is listed in Fig. 1 and Additional file 1. It is the same as in ref [2], except that we discarded GABA-B receptor, Tamalin and LIM kinase (because we were unable to find evidence from the literature for physical interaction of these proteins

with the PSD scaffold), as well as Kir and Mint (the latter is a presynaptic adaptor protein [37] ; the former is a large family of inwardly rectifying potassium channels which is not particularly associated with the PSD, see [38]). In addition to the full protein alignments, we built a separate alignment for PDZ domains (as in ref [2] but with an extended gene sampling) and constructed specific alignments for the SAM and SH3 domains of Shank. The starting data set [2] comprised sequences from *Saccharomyces cerevisiae* (Ascomycota, Fungi), plants (*Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*), *Dictyostelium discoideum* (Ameobozoa), *Amphimedon queenslandica* (Demospongiae, Porifera), *Nematostella vectensis* (Anthozoa, Cnidaria), *Drosophila melanogaster* (Hexapoda, Arthropoda) and *Homo sapiens*. These files were updated by TBLASTN searches (using proteins from *Drosophila melanogaster* as input sequences) on the most up-to-date collections of predicted transcripts from plants (*Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*), *Dictyostelium discoideum* (Ameobozoa), fungi (*Batrachochytridium dendrobatidis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Ustilago maydis*, *Rhizopus oryzae*), *Monosiga breviculis* (Choanoflagellata), *Trichoplax adhaerens* (Placozoa), cnidarians (*Hydra magnipapillata*, Hydrozoa, and *Nematostella vectensis*, Anthozoa), and *Capitella* sp. (Lophotrochozoa, Annelida). An E-value threshold was determined empirically for each protein family by using the E-value associated with the closest parologue retrieved from Blast of the fly protein against the fly genome (see Additional file 2: E-values used for each family, with names and accession numbers of the closest fly paralogues).

#### Alignments and phylogenetic analyses

Sequences retrieved from Blast searches were automatically integrated into the corresponding alignments and aligned using CLUSTALW, implemented in our in-house automated Blast and alignment pipeline. Alignments were slightly corrected manually for elimination of major mistakes. Ambiguous regions were identified by visual inspection and removed manually and positions containing more than 80% of missing data were deleted. When several non-overlapping partial sequences were present in the same alignment, the alignment was split into several partitions to avoid artificial grouping in the trees of non-overlapping sequences (observed in preliminary Maximum Likelihood analyses). These partitions, labelled "A, B, C, ..." (see Additional file 1), were analysed separately. The alignments are given in Additional file 3.

Maximum-Likelihood (ML) analyses were performed using the PhyML program [39], with the WAG model of amino-acid substitution and a BioNJ tree as the input tree. A gamma distribution with four discrete categories was used in these ML analyses. The gamma shape

parameter and the proportion of invariant sites were optimised during the searches. Branch support was tested with bootstrapping (100 replicates). Bayesian analyses were done with Mr Bayes under the WAG model (prset=invgamma). For each data set, two searches were run in parallel for 500,000 generations, representing 20 times the number of generations discarded as burn in (first 25,000 trees, determined by stabilisation of the likelihoods). We estimated convergence by checking the "average standard deviation in partition frequency values across independent analyses", using a threshold value of 0.05. Since for most alignments the number of phylogenetically informative positions is low with respect to the number of sequences, trees contain a high number of unstable nodes and therefore it was not possible to constrain searches for convergence with a lower threshold value. In some cases, this threshold of 0.05 was not reached after 500,000 generations (and concomitantly stationarity of the likelihoods was not reached after 25,000 generations). Then, burn-in was expanded and search was prolonged until the index had dropped below 0.05. Posterior probabilities were estimated by constructing a majority-rule consensus of trees sampled every 100 generations. Trees were rooted as in ref [2].

After preliminary (not shown) phylogenetic analyses, all (protein/species) absences were further tested by additional Blast searches on the full (when possible, assembled) nucleotide genome sequences of the corresponding species, with a very relaxed E-value (10) to ensure that these genes have not been missed due to limitations of the initial Blast searches (i.e. the use of predicted transcript data sets, or too strict E-values). In several cases, these genomic searches detected protein orthologues that had been missed during initial searches on predicted transcripts (e.g. IP3R in *Hydra magnipapillata*; PMCA in *Capitella* sp.). In these cases, protein alignments were updated using the procedure described above, prior to final phylogenetic analyses (trees shown in Additional file 4).

#### Orthology assignments

An orthology group is here defined as the clade containing all sequences that are more closely related to the fly and/or human sequence(s) of reference than to any parologue of ancient origin (i.e. resulting from duplication before the last common ancestor of bilaterians). Our orthology assessments therefore rely primarily on gene tree topologies, and the yellow fields in Fig. 1 indicate the presence of an orthologue, based on the corresponding gene tree. Three additional criteria were taken into account to estimate confidence for these orthology assignments: (i) support values (ML bootstrap support  $\geq 70\%$  and/or Bayesian posterior probability  $\geq 0.95$  ("b" in Fig. 1), (ii) congruence between separate analyses of partitions of the same protein alignment (labelled A,

Proteins	<i>Arabidopsis</i>	<i>Oryza</i>	<i>Dictyostelium</i>	<i>Batrachochytridium</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Neurospora</i>	<i>Ustilago</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Monosiga</i>	<i>Trichoplax</i>	<i>Amphimedon</i>	<i>Nematostella</i>	<i>Hydra</i>	<i>Capitella</i>	<i>Drosophila</i>	<i>Homo</i>
$\alpha$ -catenin										cd		cd		bcd		
Classical Cadherin										b	bd	bd	b	bd		
CaMK II										bd	bd	b	bd	bd		
CASK										d		bd	d	d		
$\beta$ -catenin	cd	cd		d	cd	d	d	d	d	d	cd	cd	cd			
$\gamma$ -catenin										d	bcd	bcd	b	bcd		
Citron										bc	bcd	bc	bcd	bcd	bcd	
Cortactin										cd	d	cd	cd	cd	cd	
CRIP1																
Ephrin R										b	b	bd	bd	b	bd	
ErbB R											bd					
GKAP											d	d	d	d		
Homer										bd	bd	bd	bd	b	bd	
AMPAR																bd
NMDAR												d				bd
IP3R										bd	bd	bd	bd	b	bd	
mGluR											d	d	d	d	d	
Neuroligin												d				d
NOS											bcd	bcd	bcd	bcd	cd	
PKC $\delta$ / $\gamma$										d	d	d	d	d	d	
PMCA	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d			
K+ Channel Shaker										d	d	d	d			
SPAR											db	db	db	db		
SynGAP											bd	bd	b	bd		
Stargazin														bd		
<b>PDZ domains</b>																
DLG											cd	cd	cd	cd	cd	
Shank											cd	cd	cd	cd	cd	
GRIP												bcd				bcd
S-SCAM											bd	bcd	bcd	bcd	bcd	
LIN-7											d	d	d	d	d	
Erbin													d	d	d	
PICK1											bd	bd	bd	bd	bd	

**Figure 1 Summary of the occurrence of post-synaptic proteins in the investigated genomes.** Yellow fields indicate presence of an orthologue as determined from the corresponding gene tree topology. Letters correspond to the three additional confidence criteria for orthology assignments defined in the Methods section: b, ML bootstrap value  $\geq 70\%$  and/or Bayesian posterior probability  $\geq 0.95$ ; c, congruence between at least two partitions of the same protein or between different domains; d, conservation of domain architecture. Note that *Homo* and *Drosophila* have been used as reference taxa for defining the orthology groups.

B, ...: see above) or between different domains of the same protein ("c" in Fig. 1), (iii) comparison of domain architectures reconstructed using Smart <http://smart.embl-heidelberg.de/> and Pfam <http://pfam.sanger.ac.uk/search>. Domain architecture was considered as conserved ("d" in Fig. 1) if the main functional domain(s) existing in the human and fly proteins were present and showed similar arrangement. These domain reconstructions are shown in Additional file 5. They were systematically done for the *Monosiga* and *Trichoplax* putative orthologues of human PSD proteins. In addition, we compared the five C-ter residues of PDZ-binding proteins in search of PDZ ligand conservation (Additional file 6), but the extent of sequence variability observed among PDZ ligands across taxa and proteins is so high that in practice it is generally impossible to conclude either for or against presence of a PDZ ligand. In addition, intron positions and frames were determined for the Shank proteins using NCBI sequence viewer (human and fly proteins) or JGI browse tool (proteins from *Capitella*, *Nematostella* and *Monosiga*) and the alignment procedure described above.

#### Reconstruction of protein acquisitions and losses onto the taxon phylogeny

Presence/absence of the PSD proteins across our species sampling was formalised into a taxon/character matrix. These characters were mapped onto the taxon

phylogeny under parsimony and a Dollo model of gene gain/loss (each protein has been acquired only once - no convergence - and proteins can be lost but not re-acquired - no reversion). We used the taxon phylogeny of [34], as it is the most comprehensive phylogenomic study of basal metazoan relationships to date. This means in particular that our interpretation of the data relies upon a hypothesis of eumetazoan monophyly (here represented by Cnidaria + Bilateria). However, basal metazoan relationships remain controversial (see alternative views in [28,29,31]), and the reconstruction may differ under alternative topologies. Since the relationships between sponges, *Trichoplax* and eumetazoans (here represented by cnidarians and bilaterians) were unsupported in ref [34], the reconstruction was done under the three possible tree topologies.

## Results and Discussion

### Reconstructing evolutionary acquisitions and losses of the major PSD components

Starting from the PSD protein and domain alignments of ref [2] we have extended the taxonomic coverage by adding genes retrieved from the complete genomes of several additional fungal species, the choanoflagellate *Monosiga brevicolus*, the placozoan *Trichoplax adhaerens*, the cnidian *Hydra magnipapillata* and the annelid *Capitella* sp. Protein/domain orthology was

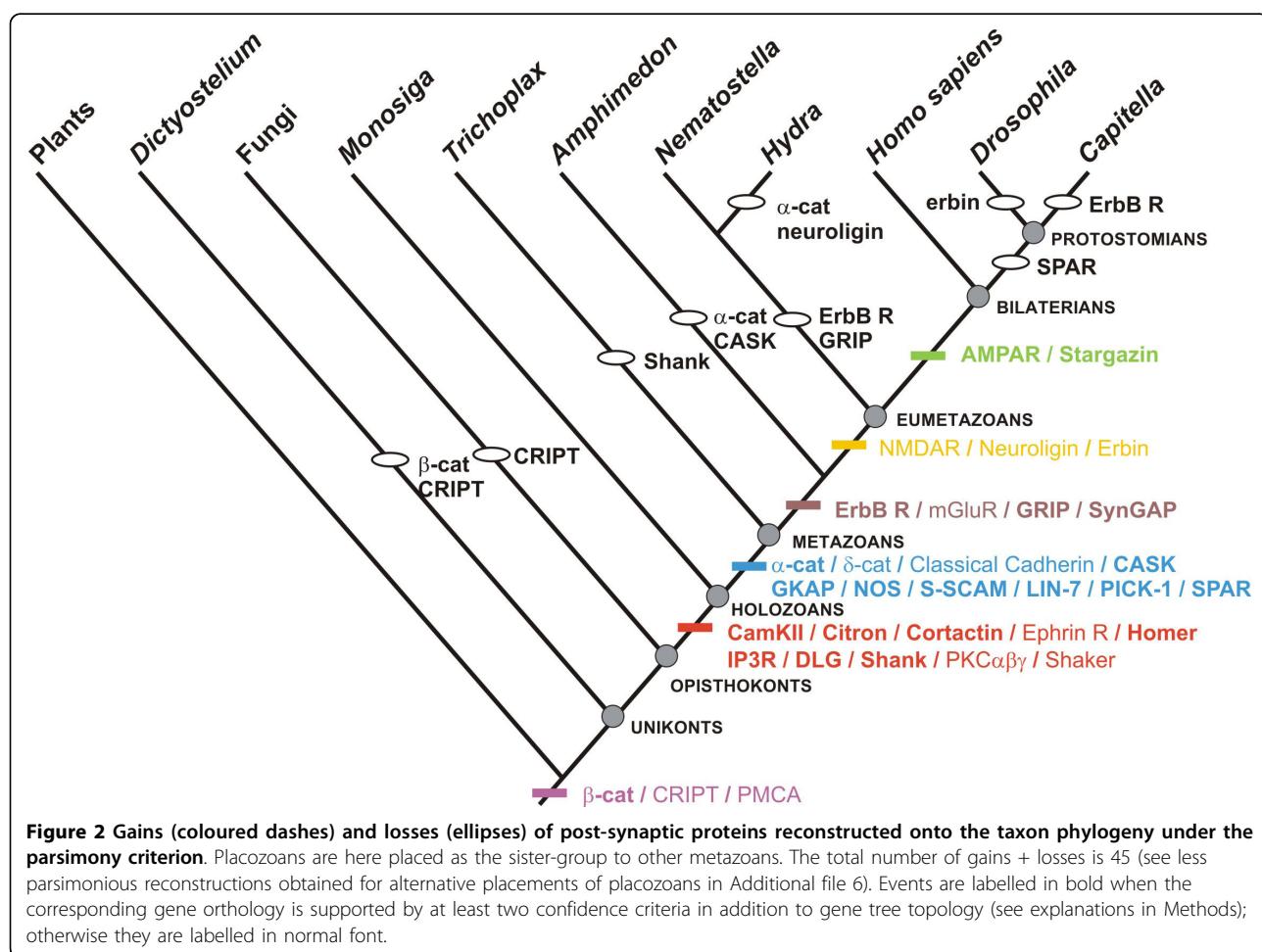
determined based on gene trees (Additional file 4) and comparison of domain structures (Additional file 5). Results are summarised in Fig. 1, with a more detailed overview in Additional file 1. The most parsimonious reconstruction of protein acquisitions and losses is shown in Fig. 2 (see less parsimonious reconstructions obtained for alternative placements of *Trichoplax*, in Additional file 7). The inferred order of emergence of the genes is indicated by a colour code in Fig. 2 and Fig. 3. In Fig. 2, gene gains/losses are labelled in bold when orthology is supported by at least two criteria of confidence (in addition to gene tree topology; see Fig. 1 and Methods); otherwise they are labelled in normal font.

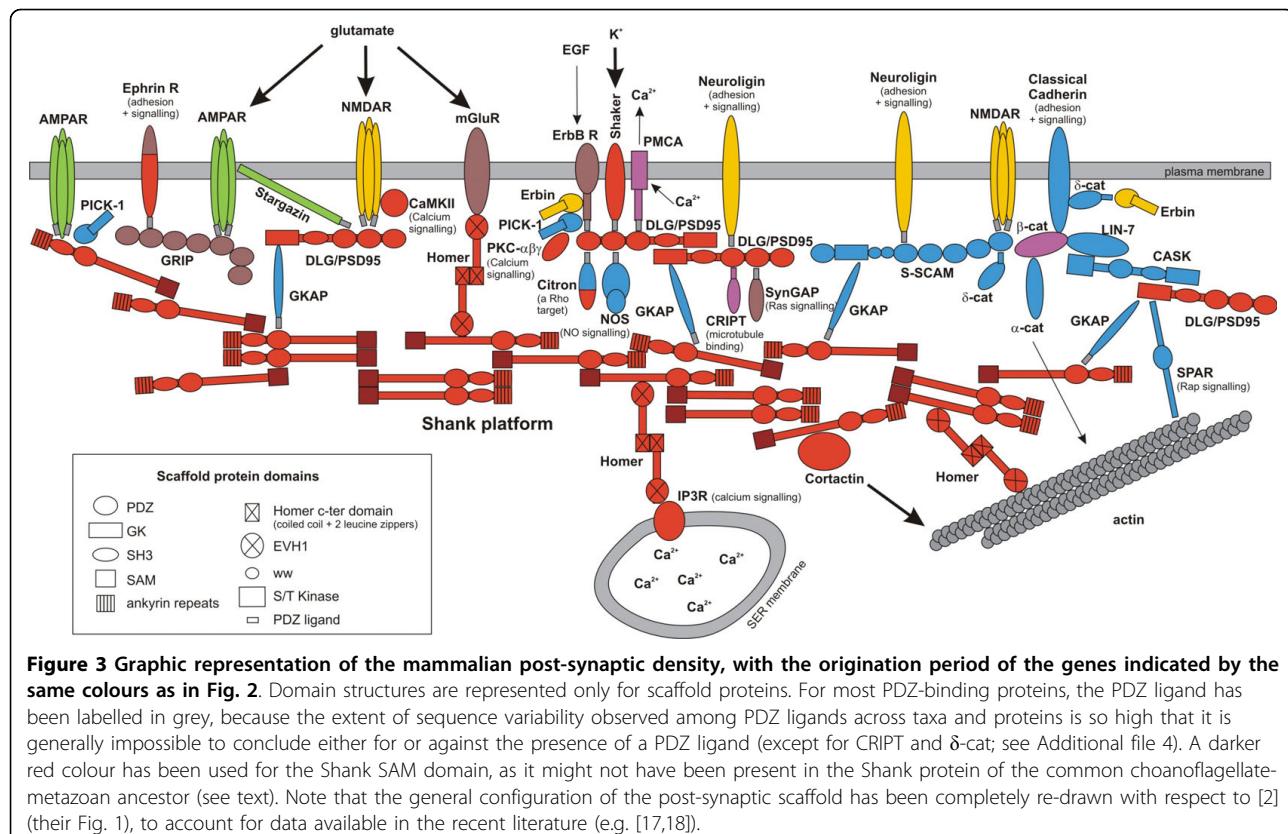
#### PSD components originated in two main steps

Protein acquisitions are concentrated in the two branches preceding and following the divergence of choanoflagellates in the opisthokont phylogeny (Fig. 2). A significant protein set originated in an exclusive ancestor of choanoflagellates and metazoans. This includes the scaffold proteins Shank, Homer and DLG, and the other PSD components CamKII, Citron, Cortactin, Ephrin R, IP3R, PKC $\alpha\beta\gamma$  and Shaker K $^{+}$  channels.

Another set, including the scaffold proteins CASK, GKAP and S-SCAM (= Magi), and the other PSD components  $\alpha$  and  $\delta$ -catenin, classical Cadherins, NOS, LIN-7, PICK1 and SPAR, is synapomorphic for the Metazoa. Very few proteins are of more ancient origin: PMCA (present in all investigated eukaryotes),  $\beta$ -catenin (present in plants and fungi) and CRIPT (present in plants).

A significant implication is that several core components of the mammalian PSD (red colour in Fig. 3) originated not only before the acquisition of synapses and nerve cells (absent in sponges and placozoan), but even before the acquisition of multicellularity, given that the choanoflagellate-metazoan ancestor was unequivocally unicellular [1,8]. Notably, the scaffold proteins Shank, Homer and DLG/PSD95, known in mammals to structure the post-synaptic density by linking a huge variety of target proteins (e.g. membrane receptors, components of signal transduction pathways, cytoskeleton-interacting proteins, etc.), originated before the divergence of the choanoflagellates. In our analyses, the orthology of Homer and DLG between choanoflagellates





**Figure 3** Graphic representation of the mammalian post-synaptic density, with the origination period of the genes indicated by the same colours as in Fig. 2. Domain structures are represented only for scaffold proteins. For most PDZ-binding proteins, the PDZ ligand has been labelled in grey, because the extent of sequence variability observed among PDZ ligands across taxa and proteins is so high that it is generally impossible to conclude either for or against the presence of a PDZ ligand (except for CRIP and  $\delta$ -cat; see Additional file 4). A darker red colour has been used for the Shank SAM domain, as it might not have been present in the Shank protein of the common choanoflagellate-metazoan ancestor (see text). Note that the general configuration of the post-synaptic scaffold has been completely re-drawn with respect to [2] (their Fig. 1), to account for data available in the recent literature (e.g. [17,18]).

and metazoans is well supported by the corresponding gene trees, the conservation of their domain structure, high bootstrap support (for Homer) and the congruence between the evolutionary histories of the domains (for DLG) (see Fig. 1).

#### Shank emerged before the divergence of choanoflagellates

The Shank protein is considered as the “master-scaffolding” molecule of the PSD [17,18]. Our PDZ tree identifies a putative choanoflagellate orthologue of metazoan Shank PDZs (PDZ tree in Additional file 4). This orthology assignment is not supported by statistical indices, but several additional lines of evidence argue in favour of orthology. The *Monosiga* protein that contains the putative Shank PDZ shows the combination of protein-interacting domains typical of vertebrate Shanks (N-ter ankyrin repeats, a SH3 domain, a PDZ domain, and a SAM C-ter domain), a domain structure that is unique among vertebrate proteins. Reciprocal Blast searches support orthology between the ankyrin repeats present in this *Monosiga* protein and those of metazoan Shanks (not shown - note that phylogenetic analyses of ankyrin repeats are not feasible). In addition, the putative *Monosiga* Shank protein shares with metazoan Shanks the presence of a conserved N-terminal 126-amino-acids region (upstream of the Ankyrin repeats) with no

similarity to any other protein sequence (not shown result of Blast search against NCBI referenced proteins) (see alignment of this N-terminal region in Additional file 8). Within this region, there are two introns with position conserved down to the phase and present in metazoan Shanks as well as in the *Monosiga* protein (red boxes in the alignment, Additional file 8). Finally, we analysed SH3 domains and found that the SH3 domain of the *Monosiga* putative Shank falls in a clade that contains all metazoan Shank SH3s (and two non-Shank SH3s, from *Drosophila* and *Hydra*) (see SH3 tree in Additional file 4).

These observations indicate that *Monosiga* has a *bona fide* orthologue of Shank. Although there is no experimental evidence that in the choanoflagellate cell Shank acts like its mammalian orthologues, the conserved domain combination suggests comparable scaffold properties. In addition, some of the proteins known in mammals to interact directly with Shank (including Homer, the IP3 receptor, and Cortactin) are also present in *Monosiga*.

The history of Shank has been slightly more complex in the details. Our phylogenetic analyses suggest that the SAM C-ter domain of *Monosiga* Shank might not be orthologous to the SAM domains present in some (but not all) metazoan Shanks (see SAM tree in Additional

file 4). A SAM domain might thus have been added independently in choanoflagellate and metazoan Shanks. This convergence event could have occurred by chance, or it may have been favoured by similar functional constraints acting on the Shank protein. A second peculiarity of choanoflagellate Shank is that its SH3 domain is located between PDZ and SAM, whereas in metazoans it is placed between the Ank repeats and the PDZ domain, indicating that a domain inversion took place in one of these two lineages. We compared intron positions along the Shank proteins of metazoans and *Monosiga* without finding evidence for or against this hypothesis of domain inversion (Additional file 8).

#### Evolution of the PSD protein repertoire within the Metazoa

Compared to the gene complement present in eumetazoan genomes, different gene subsets happen to be absent in the two nerve-less species *Amphimedon queenslandica* (sponge) and *Trichoplax adhaerens* (placozoan). This makes the reconstruction of acquisition/losses in this region of the tree highly sensitive to the phylogenetic placement of placozoans with respect to sponges and eumetazoans. *Trichoplax* lacks orthologues of Shank (present in *Monosiga*, sponges and eumetazoans), GRIP, ErbB R, mGluR and SynGAP (present in sponges and at least some eumetazoans). If *Trichoplax* is the sister-group to other metazoans (Fig. 2), then GRIP, ErbB R, mGluR, and SynGAP were absent in the metazoan ancestor and are synapomorphic for sponges + eumetazoans (brown colour in Fig. 2 and 3). The same taxon phylogeny implies secondary loss of  $\alpha$ -catenin and CASK (present in *Trichoplax* and in eumetazoans) in the sponge lineage. Alternative taxon phylogenies (e.g. *Trichoplax* sister-group to eumetazoans as in [34]) imply secondary losses of GRIP, ErbB R, mGluR and SynGAP in placozoans (Additional file 7). Whatever the position of placozoans, the parsimony optimisation suggests secondary loss of Shank in *Trichoplax adhaerens*.

The apparent loss of Shank in placozoans is particularly puzzling as Shank is the main protein responsible for the higher-order structure of the PSD in mammals [18]. However, alternative scenarios cannot be ruled out at this stage, e.g., Shank could have been overlooked due to incomplete coverage of the *T. adhaerens* genome (currently 8 $\times$ ), or the gene might have diverged in the placozoan lineage to the extent that it is no longer recognisable, or it might have been lost in *Trichoplax adhaerens* but not in other placozoan species. If confirmed by future studies, loss of Shank in placozoans would imply disruption or at least considerable alteration of the macromolecular architecture of the PSD-like protein complex. In addition, the *Trichoplax* situation is somewhat difficult to understand

when it is realised that Homer and Cortactin, known as direct Shank partners in mammals and present in the *Monosiga* genome, are still present in *Trichoplax* despite apparent absence of Shank. As an alternative possibility, Shank could have been replaced by another protein. Functional work is certainly needed in *Trichoplax* to determine the molecular interactions and cellular functions of these proteins. Whether these genes are expressed in the fibre cells, proposed by some [40] to represent a placozan neural-like cell type, will be important to assess. However, placozoans are not likely to teach us much about the ancestral properties and functions of PSD proteins prior to the emergence of a nervous system, because the absence of Shank (if confirmed) makes their PSD-like complex totally idiosyncratic.

Whereas the emergence of nerve cells and synapses in a eumetazoan ancestor was seemingly not accompanied by a significant expansion of the PSD complex in terms of protein number, the few proteins acquired in this branch are significant with respect to neural function. They include the ionotropic glutamate receptors NMDAR (involved in synaptic transmission) and the Neuroligins (involved in synaptic adhesion and signalling in synaptogenesis, through interaction with their ligands the Neurexins [41,42]). Within eumetazoans, we inferred a few protein losses: ErbB receptor and GRIP (a scaffold protein) in cnidarians,  $\alpha$ -catenin and Neuroligin in *Hydra*, SPAR in protostomians, Erbin in *Drosophila* and ErbB receptor in the annelid *Capitella*. Curiously enough, there is no concomitant loss of proteins known to interact with each other (e.g. losses of Erbin are not associated with losses of the ErbB receptor), suggesting that proteome and interactome evolved to a large extent independently, or that protein interactions in non-model organisms differ substantially from what happens in the mammalian synapse.

#### What were the ancestral functions of the PSD protein complex?

Comparative genomics contributes to our understanding of hierarchy in biological systems, by sorting ancient components from more recent additions, a basis for making predictions about ancestral interactions and functions. In bilaterian animals, the PSD is tightly linked functionally to intercellular signalling at the synapse. However, the proto-PSD of the choanoflagellate/metazoan ancestor (red + violet colours in Fig. 3) was probably not involved in intercellular signalling, since all post-synaptic membrane receptors linked to the mammalian PSD (the different kinds of glutamate receptors, Neuroligin, ErbB receptor, receptor domain of the Ephrin receptor) are of more recent origin. In addition, the global structure of the ancestral proto-PSD, which lacks several important scaffold proteins (GRIP, S-

SCAM, CASK), was certainly much simpler than that of the mammalian PSD.

Shank and its conserved direct or indirect partners appear to form the ancestral core of the post-synaptic protein complex (Fig. 3). The associated functions are actin cytoskeleton regulation (Homer links actin to Shank; the actin-regulating protein Cortactin binds to Shank) and  $\text{Ca}^{2+}$  signalling (Homer links the IP<sub>3</sub> receptor to Shank; CaMKII and PKC $\alpha\beta\gamma$ , also involved in  $\text{Ca}^{2+}$  signalling, are present in the choanoflagellate genome). It is thereby proposed here that the main function of the ancestral Shank interactome was to provide a link between intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signalling and actin cytoskeleton regulation.

The DLG scaffold protein might have ancestrally formed the centre of an additional interactome, possibly independent from the Shank module (GKAP, the physical link between DLG and Shank in mammals, is absent in *Monosiga*). We identified three DLG partners with clear orthologues in the choanoflagellate genome: CRIPT (a microtubule-interacting protein [43]), the K<sup>+</sup> channel Shaker, and the  $\text{Ca}^{2+}$  plasma membrane channel PMCA. The choanoflagellate orthologue of Citron (a Rho target) is not likely to interact with DLG as in mammals because only the most N-ter part of the protein shows homology with mammalian Citron (Fig. 3). These observations suggest ancestral functions of the DLG interactome in concentrating cation channels on particular plasma membrane areas, and in providing a link between these channels and the regulation of microtubule polymerisation.

From a morphological point of view, the choanoflagellate + metazoan clade is characterised by a unique synapomorphy: acquisition of an apical cell complex with a central flagellum surrounded by a collar of microvilli. This is suggested by the close resemblance between apical cell complexes of choanoflagellates and of sponge choanocytes [44]. According to some [45], this flagellum-collar structure would be homologous with the apical complex of eumetazoan sensory cells. Because choanoflagellate collar microvilli are contractile and labile structures (suggesting highly dynamic regulation), and because their cytoskeleton is principally made of F-actin, it is tempting to speculate about a possible functional link between the emergence of the proto-PSD and the acquisition of the flagellum-collar apical complex. This hypothesis can be tested by determining the sub-cellular localisation and function of the key proteins Shank, Homer and DLG in *Monosiga*. Another stimulating path for future investigation on the ancestral functions of core PSD components will involve the characterisation of physical interactions between the various choanoflagellate PSD-like proteins.

## Conclusion

The backbone of the post-synaptic density, notably featuring the scaffold proteins Shank, Homer and DLG, was acquired in a common ancestor of choanoflagellates and metazoans, in a unicellular context. It was probably not involved in cell-cell communication, but rather in linking transmembrane cation currents, calcium signalling, and cytoskeleton regulation. Future investigations on complete genome sequences of unicellular opisthokonts that are more closely related to the choanoflagellate + metazoan clade than to Fungi (ichthyosporsids and *Capsaspora*) [1] might happen to push even earlier the period of origination of these proteins.

After the addition of several novel components (among which GKAP, the link between DLG and Shank, and the CASK/S-SCAM/classical cadherin interactome), metazoan ancestors became endowed with a nearly complete set of PSD proteins (violet + red + blue colours in Fig. 3). Proteins that are specifically involved in synaptic transmission (i.e. AMPAR, NMDAR and mGluR) or adhesion (neuroligin) in eumetazoans were nevertheless absent from this ancestral animal repertoire (except possibly for mGluRs, present in the metazoan ancestor if *Trichoplax* is not the basal-most lineage, see Additional file 7). This suggests that PSD proteins ancestrally acted in a non-synaptic context, in consistency with the probable monophyly of Eumetazoa [34] and its corollary, that the last common ancestor of all metazoan animals was nerve-less. In this ancestor, the PSD-like complex was probably a sub-membrane platform for bringing together molecules involved in cation currents,  $\text{Ca}^{2+}$  and other signalling pathways, and cytoskeleton regulation, possibly (but not necessarily) in relation to cell sensitivity to external stimuli. The complex later became integrated into the evolving synapse, in a eumetazan ancestor, through the addition of novel proteins and functionalities.

**Additional file 1: Detailed overview of the results from the phylogenetic analyses.** Grey lines: presence or absence of orthologue(s) for each protein group in each species. White lines: number of orthologues (if any) identified for each alignment or alignment partition. Click here for file  
[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2148-10-34-S1.XLS>]

**Additional file 2: Table indicating the threshold E-values used for Blast searches for each family of investigated genes, and the closest parologue retrieved from the fly genome.**

Click here for file  
[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2148-10-34-S2.XLS>]

**Additional file 3: Protein sequence alignments used for phylogenetic analyses.** The alignments are in Phylip format.

Click here for file  
[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2148-10-34-S3.RAR>]

**Additional file 4: Maximum Likelihood phylogenetic trees of the post-synaptic proteins and of the PDZ, SAM and SH3 domains (arranged in alphabetic order).** Maximum likelihood bootstraps (ML bs) and Bayesian posterior probabilities (Bay pp) are indicated only for the main orthology groups. Abbreviations for taxon names: Aqu = *Amphimedon queenslandica*, Ath = *Arabidopsis thaliana*, Bde = *Batrachochytridium dendrobatidis*, Cca = *Capitellasp.*, Ddi = *Dictyostelium discoideum*, Dme = *Drosophila melanogaster*, Hma = *Hydra magnipapillata*, Hsa = *Homo sapiens*, Mbr = *Monosiga brevicollis*, Ncr = *Neurospora crassa*, Nve = *Nematostella vectensis*, Osa = *Oryza sativa*, Ror = *Rhizopus oryzae*, Sce = *Saccharomyces cerevisiae*, Tad = *Trichoplax adhaerens*, Uma = *Ustilago maydis*. Except for plant, yeast, slime mold, sponge, fly and human sequences, genes are named by using a neutral code consisting in the taxon abbreviation followed by a letter (different for each protein family) and a number. Thanks to this label, a given gene can be identified across different partitions of the same alignment or different domains of the same protein (e.g. for Shank in the PDZ, SAM and SH3 trees).

Click here for file  
[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2148-10-34-S4.PDF>]

**Additional file 5: Domain architectures of selected members of the post-synaptic gene families (in alphabetic order).** Abbreviations used in displays for taxon names are as in Additional file 2.

Click here for file  
[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2148-10-34-S5.PDF>]

**Additional file 6: The C-ter five residues of the PDZ-binding post-synaptic proteins, for metazoan species and Monosiga.**

Click here for file  
[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2148-10-34-S6.XLS>]

**Additional file 7: Gains (coloured dashes) and losses (ellipses) of post-synaptic proteins reconstructed with placozoans as the sister-group to sponges, and with placozoans as the sister-group to eumetazoans.** The number of gains + losses is indicated for each tree.

Click here for file  
[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2148-10-34-S7.PDF>]

**Additional file 8: Comparison of intron positions in the Shank proteins of metazoans and Monosiga.** Overview of intron distribution along the whole protein sequences (A) and detailed view of intron position on the alignment of the N-terminal region upstream of the Ankyrin repeats (B).

Click here for file  
[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2148-10-34-S8.DOC>]

3. Putnam NH, Srivastava M, Hellsten U, et al: Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science* 2007, 317:86-94.
4. Grimson A, Srivastava M, Fahey B, et al: Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature* 2008, 455:1193-1197.
5. Exposito J, Larroux C, Cluzel C, et al: Demosponge and sea anemone fibrillar collagen diversity reveals the early emergence of A/C clades and the maintenance of the modular structure of type V/XI collagens from sponge to human. *J Biol Chem* 2008, 283:28226-28235.
6. Manning G, Young SL, Miller WT, Zhai Y: From the Cover: The protist, *Monosiga brevicollis*, has a tyrosine kinase signaling network more elaborate and diverse than found in any known metazoan. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105:9674-9679.
7. Larroux C, Luke GN, Koopman P, et al: Genesis and expansion of metazoan transcription factor gene classes. *Mol Biol Evol* 2008, 25:980-96.
8. King N, Westbrook MJ, Young SL, et al: The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature* 2008, 451:783-8.
9. Rokas A: The origins of multicellularity and the early history of the genetic toolkit for animal development. *Annu Rev Genet* 2008, 42:235-251.
10. Kosik KS: Exploring the early origins of the synapse by comparative genomics. *Biol Lett* 2009, 5:108-111.
11. Collins MO, Husi H, Yu L, et al: Molecular characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome. *J Neurochem* 2006, 97(1):16-23.
12. Grant SGN: The synapse proteome and phosphoproteome: a new paradigm for synapse biology. *Biochem Soc Trans* 2006, 34:59-63.
13. Pocklington AJ, Armstrong JD, Grant SGN: Organization of brain complexity—synapse proteome form and function. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2006, 5:66-73.
14. Klemmer P, Smit AB, Li KW: Proteomics analysis of immuno-precipitated synaptic protein complexes. *J Proteomics* 2009, 72:82-90.
15. Yamauchi T: Molecular constituents and phosphorylation-dependent regulation of the post-synaptic density. *Mass Spectrom Rev* 2002, 21:266-286.
16. Nishimura W, Yao I, Iida J, Tanaka N, Hata Y: Interaction of synaptic scaffolding molecule and Beta-catenin. *J Neurosci* 2002, 22:757-765.
17. Boeckers TM: The postsynaptic density. *Cell Tissue Res* 2006, 326:409-422.
18. Kreienkamp H: Scaffolding proteins at the postsynaptic density: shank as the architectural framework. *Handb Exp Pharmacol* 2008, 365-380.
19. Ehlers MD: Molecular morphogens for dendritic spines. *Trends Neurosci* 2002, 25:64-67.
20. Vessey JP, Karra D: More than just synaptic building blocks: scaffolding proteins of the post-synaptic density regulate dendritic patterning. *J Neurochem* 2007, 102:324-332.
21. Shirashi-Yamaguchi Y, Furuichi T: The Homer family proteins. *Genome Biol* 2007, 8:206.
22. Richards GS, Simionato E, Perron M, et al: Sponge genes provide new insight into the evolutionary origin of the neurogenic circuit. *Curr Biol* 2008, 18:1156-61.
23. Nielsen C: Six major steps in animal evolution: are we derived sponge larvae?. *Evol Dev* 2008, 10:241-257.
24. Medina M, Collins AG, Silberman JD, Sogin ML: Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:9707-9712.
25. Manuel M, Borchiellini C, Alivon E, et al: Phylogeny and evolution of calcareous sponges: monophly of calcinea and calcaronea, high level of morphological homoplasy, and the primitive nature of axial symmetry. *Syst Biol* 2003, 52:311-333.
26. Nielsen C: Animal evolution: interrelationships of the living phyla. New York: Oxford University Press, 2 2001.
27. Brusca RC, Brusca GJ: *Invertebrates* Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2 2003.
28. Schierwater B, Eitel M, Jakob W, et al: Concatenated analysis sheds light on early metazoan evolution and fuels a modern "urmetazoon" hypothesis. *PLoS Biol* 2009, 7:e20.
29. Dunn CW, Hejnol A, Matus DQ, et al: Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 2008, 452:745-9.

## Acknowledgements

We thank Sylvie Retaux and Hervé Le Guyader for insightful advice. We are grateful to Philippe Lopez for help with the phylogenetic analyses. This work was supported by a grant from the GIS "Institut de la Génomique Marine" - ANR "programme blanc" NT\_NV\_52 Genocnidaire.

## Authors' contributions

AA and MM conceived and designed the analyses. AA performed the data collection and the analyses. MM drew the figures. AA and MM wrote the paper. Both authors read and approved the final manuscript.

Received: 13 July 2009

Accepted: 3 February 2010 Published: 3 February 2010

## References

1. Ruiz-Trillo I, Roger AJ, Burger G, Gray MW, Lang BF: A phylogenomic investigation into the origin of metazoa. *Mol Biol Evol* 2008, 25:664-72.
2. Sakarya O, Armstrong KA, Adamska M, et al: A post-synaptic scaffold at the origin of the animal kingdom. *PLoS ONE* 2007, 2:e506.

30. Dellaporta SL, Xu A, Sagasser S, et al: Mitochondrial genome of Trichoplax adhaerens supports placozoa as the basal lower metazoan phylum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:8751-8756.
31. Hejnol A, Obst M, Stamatakis A, et al: Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proc Biol Sci* 2009, **276**(1677):4261-70.
32. Miller DJ, Ball EE: Animal evolution: Trichoplax, trees, and taxonomic turmoil. *Curr Biol* 2008, **18**:R1003-1005.
33. Telford MJ: Animal evolution: once upon a time. *Curr Biol* 2009, **19**: R339-341.
34. Philippe H, Derelle R, Lopez P, et al: Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships. *Curr Biol* 2009, **19**:706-712.
35. Schierwater B, de Jong D, Desalle R: Placozoa and the evolution of Metazoa and intrasomatic cell differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 2009, **41**:370-379.
36. Srivastava M, Begovic E, Chapman J, et al: The Trichoplax genome and the nature of placozoans. *Nature* 2008, **454**:955-60.
37. Zamponi GW: Regulation of presynaptic calcium channels by synaptic proteins. *J Pharmacol Sci* 2003, **92**:79-83.
38. Neusch C, Weishaupt JH, Bähr M: Kir channels in the CNS: emerging new roles and implications for neurological diseases. *Cell and Tissue Research* 2003, **311**:131-138.
39. Guindon S, Gascuel O: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 2003, **52**:696-704.
40. Hadrys T, DeSalle R, Sagasser S, Fischer N, Schierwater B: The Trichoplax PaxB gene: a putative Proto-PaxA/B/C gene predating the origin of nerve and sensory cells. *Mol Biol Evol* 2005, **22**:1569-1578.
41. Gerrow K, El-Husseini A: Cell adhesion molecules at the synapse. *Front Biosci* 2006, **11**:2400-2419.
42. Dalva MB, McClelland AC, Kayser MS: Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2007, **8**:206-220.
43. Passafaro M, Sala C, Niethammer M, Sheng M: Microtubule binding by CRIP and its potential role in the synaptic clustering of PSD-95. *Nat Neurosci* 1999, **2**:1063-1069.
44. Maldonado M: Choanoflagellates, choanocytes, and animal multicellularity. *Invert Biol* 2004, **123**:1-22.
45. Jacobs DK, Nakanishi N, Yuan D, Camara A, Nichols SA, Hartenstein V: Evolution of sensory structures in basal metazoa. *Integr Comp Biol* 2007, **47**:712-723.

doi:10.1186/1471-2148-10-34

**Cite this article as:** Alié and Manuel: The backbone of the post-synaptic density originated in a unicellular ancestor of choanoflagellates and metazoans. *BMC Evolutionary Biology* 2010 **10**:34.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



### **3.3. Article 3 : Evolution de la transmission cholinergique : expression du transporteur CHT chez *Pleurobrachia pileus***

#### **Résumé**

L’acétylcholine est l’un des principaux neurotransmetteurs mis en jeu dans les synapses des animaux Bilateria, mais la communication intercellulaire cholinergique est d’origine plus ancienne, vraisemblablement antérieure à l’origine des métazoaires. De plus, chez les vertébrés, l’acétylcholine sert également de messager paracrine dans de nombreux contextes non neuraux, et la plupart des molécules impliquées dans sa biosynthèse, sa dégradation et son recyclage sont exprimées de manière plus ou moins ubiquitaire. Ce n’est toutefois pas le cas du transporteur à haute affinité de la choline CHT, qui semble rarement exprimé en dehors des neurones cholinergiques chez les Bilateria, laissant supposer que son acquisition au cours de l’évolution pourrait avoir accompagné l’émergence de la synapse cholinergique. Nous avons identifié deux paralogues membres de la famille CHT chez *Pleurobrachia pileus*, un représentant des cténaires, seul embranchement animal en dehors des cnidaires et des Bilateria à posséder des neurones et des synapses. L’analyse phylogénétique montre que la famille des transporteurs CHT constitue une innovation des eumétazoaires (cténaires + cnidaires + Bilateria). Chez l’adulte, *PpiCHT1* est exprimé aussi bien dans des territoires neuraux (cordons nerveux des tentilles et des tentacules), que non neuraux (notamment au sein des peignes et de la gonade femelle), alors que *PpiCHT2* semble avoir uniquement une expression non neurale, à travers l’ensemble de l’épithélium du système gastro-vasculaire. Ces résultats tendent à confirmer l’existence de neurones cholinergiques chez les cténaires. Ces données suggèrent également que dès son origine le transporteur CHT a été utilisé dans des cellules aussi bien neurales que non neurales, sa restriction à la fonction neurale chez certains bilatériens représentant vraisemblablement une situation dérivée.

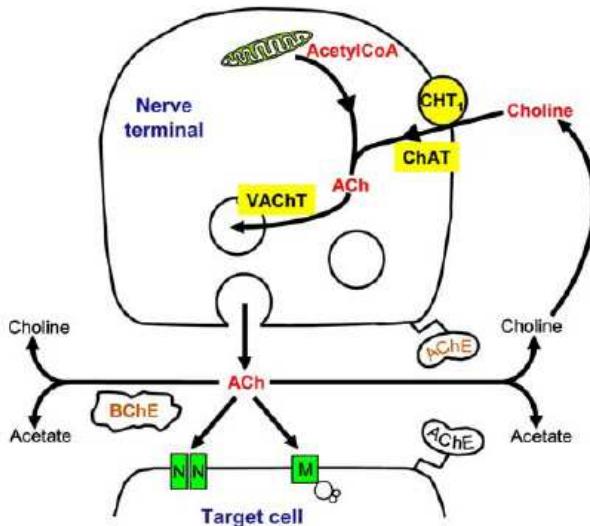
## Introduction

Le système cholinergique désigne l'ensemble des mécanismes et des composants permettant la synthèse, le transport, la libération, la dégradation et le recyclage de l'acétylcholine (ACh). L'acétylcholine est largement connue pour son rôle de neurotransmetteur chez les animaux (Zigmond 1999), mais il s'agit en réalité d'une molécule d'origine très ancienne. En effet, elle est présente à travers tout l'arbre du vivant : chez les procaryotes, les algues, les champignons, les plantes (Yamada et al. 2005 ; Horiuchi et al. 2003), bien qu'on sache peu de choses sur ses voies de biosynthèse en dehors des animaux. Ainsi, le système cholinergique serait par exemple impliqué dans la régulation osmotique et le contrôle de la photosynthèse chez les plantes (études sur l'ortie dioïque, Wessler et al. 2001) et dans la morphogenèse du lichen *Parmelia caperata* (Raineri & Modenesi 1986). Le spectre d'action de l'acétylcholine est si large que cette molécule a été qualifiée de « *universal cytotoxin* » (Wessler et al. 2001).

Chez les animaux, la communication intercellulaire utilisant l'acétylcholine a surtout été étudiée et popularisée dans le cas particulier de la synapse cholinergique. Au sein du système nerveux des Bilateria, de nombreux neurones utilisent l'acétylcholine comme neurotransmetteur (ils sont dits cholinergiques). C'est le cas notamment des motoneurones contrôlant la contraction des fibres musculaires, chez les vertébrés comme chez les nématodes (Towers et al. 2005), les mollusques (Whim et al. 1993), les urochordés (Ohmori & Sasaki 1977), et la jonction neuro-musculaire représente l'exemple canonique de synapse cholinergique (Fig. 47). L'enzyme impliquée dans la synthèse de l'acétylcholine est la choline-acétyl-transférase (ChAT), qui utilise comme substrat la choline et l'acétyl co-enzyme A (Acetyl-CoA). La choline est importée depuis l'espace extracellulaire grâce à l'activité du transporteur à haute affinité de la choline (CHT1)<sup>21</sup>. L'acétylcholine est ensuite accumulée dans des vésicules grâce à un transporteur vésiculaire (VACHT). Ces vésicules sont libérées par exocytose au niveau de la membrane présynaptique lorsque la concentration cytosolique de Ca<sup>2+</sup> augmente, suite à l'excitation du neurone présynaptique. L'acétylcholine peut se fixer sur la membrane post-synaptique sur deux types de récepteurs : nicotinique (ionotropique = récepteur-canal) et muscarinique (métabotropique = récepteur couplé à une protéine G), conduisant dans les deux cas à l'excitation de la membrane post-synaptique. L'acétylcholine est dégradée dans l'espace intercellulaire par l'acétylcholinestérase (AChE) et d'autres cholinestérases non spécifiques (p. ex. butyrylcholinestérase, BChE). Le transporteur à haute affinité de la choline CHT1 assure la re-capture

<sup>21</sup> Bien que chez l'homme ce transporteur soit appelé « CHT1 » (pour « choline high-affinity transporter 1 »), il n'existe pas de protéine humaine CHT2. Dans ce texte, la famille regroupant les orthologues du transporteur CHT1 humain chez d'autres animaux sera simplement appelée CHT.

la choline issue de cette dégradation pour la recycler continuellement. Ainsi, l'efficacité de la synapse cholinergique repose largement sur CHT1 car il permet l'approvisionnement du neurone présynaptique en grandes quantités de choline (Ribeiro et al. 2006).



**Figure 47.** Le cycle de l'acétylcholine dans la synapse cholinergique. **AChE** : acétylcholinestérase, **BChE** : butyrylcholinestérase, **ChAT** : choline-acétyl-transférase, **CHT1** : transporteur à haute affinité de la choline, **M** : récepteur muscarinique, **N** : récepteur nicotinique, **VACHT** : transporteur vésiculaire de l'ACh. *Figure issue de Kummer et al. (2008).*

L'existence ou non de la transmission synaptique cholinergique en dehors des Bilateria, c'est-à-dire chez les cnidaires et chez les cténaires, reste un point débattu. La neurotransmission chez les cnidaires est connue pour être essentiellement peptidérique (Grimmelikhuijzen et al. 1991 ; Grimmelikhuijzen & Westfall 1995 ; Kass-Simon & Pierobon 2007), mais l'emploi de drogues agissant sur le système cholinergique (p.ex. acétylcholine, antagonistes ou agonistes des récepteurs nicotinique et muscarinique) produit des effets significatifs chez divers cnidaires, sur la décharge des cnidocytes, le rythme et l'intensité des contractions musculaires (Kass-Simon & Pierobon 2007). Des expériences de localisation de l'activité enzymatique de l'AChE ont donné des résultats contrastés : une activité AchE a été détectée dans des cellules nerveuses de l'hydre (Lentz & Barnett 1961 ; 1963), mais le même type d'expérience ne révèle aucune activité AChE dans les neurones chez d'autres cnidaires (Kass-Simon & Pierobon 2007), y compris la méduse de *Clytia hemisphaerica* (Denker et al. 2008b). De plus, une étude récente indique que chez l'hydre, l'AChE est largement exprimée dans les cellules épithéliales de l'endoderme et de l'ectoderme mais apparemment pas dans les neurones (Takahashi & Hamaue 2010). A l'inverse, un orthologue de CHT1 aurait une expression neuronale chez l'hydre (Takahashi et al., poster présenté au congrès *Hydra meeting*, Tutzing, Allemagne, en septembre 2009), suggérant l'existence d'une transmission synaptique cholinergique. Chez les cténaires, on dispose d'environ moins de données. Hernandez-Nicaise (1974) a mise en évidence chez *Beroe ovata* une activité AChE, visualisée en microscopie photonique et électronique, au niveau de l'espace

extracellulaire de certaines synapses interneurales, neuro-musculaires, neuro-glandulaires et neurociliaires (pour ces dernières, il s'agit de synapses joignant des neurites aux *polster cells* des rangées de peignes). Ces données suggèrent fortement l'existence d'une neurotransmission cholinergique chez les cténaires, sans toutefois en apporter la preuve définitive, car l'accumulation d'AChE au voisinage de neurones n'implique pas nécessairement que ces derniers soient cholinergiques, cette enzyme ayant tendance à être fortement ubiquitaire chez les mammifères, tout comme l'acétylcholine elle-même.

En effet, bien au-delà de ses fonctions neurales, l'acétylcholine est produite dans un très grand nombre de types cellulaires et se trouve impliquée dans la régulation de nombreux mécanismes cellulaires, par exemple, chez l'homme, la prolifération cellulaire, la différenciation, le contact cellulaire, l'immunité, la sécrétion (voir par exemple Mayerhofer & Kunz 2005 ; Duncan & Collison 2003 ; Wessler et al. 2003 ; revue dans Wessler et al. 2001). On parle de « fonctions non neurales » du système cholinergique. Corrélativement, la plupart des composants du système cholinergique sont exprimés de façon plus ou moins ubiquitaire. Ainsi, l'enzyme de biosynthèse ChAT est exprimée dans la majorité des cellules humaines : neurones, cellules épithéliales, leucocytes, spermatozoïdes, cellules musculaires, etc. (Wessler et al. 2001). Les précurseurs, choline et Acetyl-CoA, sont eux-mêmes des molécules ubiquitaires impliquées dans le métabolisme de base des cellules. En effet, la choline est une amine principalement utilisée pour la synthèse de composants membranaires (phosphatidylcholine et sphingomyéline). Par ailleurs, les récepteurs nicotiniques et muscariniques sont largement exprimés par des cellules non neurales. Enfin, l'AChE et les autres cholinestérases sont également très largement distribuées. En particulier, leur abondance dans le sang garantit que l'acétylcholine agisse de façon para- ou autocrine, et non comme une hormone (Wessler et al. 2001). Il faut enfin noter que certains mécanismes liés à l'acétylcholine opèrent selon des modes plus variés dans le contexte non neural que dans le contexte neural : ainsi, la biosynthèse peut impliquer d'autres enzymes que ChAT (p.ex. la carnitine acetyltransferase), la sécrétion non neurale se fait souvent par d'autres mécanismes que l'exocytose (Kummer et al. 2008 ; Lips et al. 2005), et l'importation dans les cellules non neurales met le plus souvent en jeu des transporteurs de la choline à faible ou moyenne affinité Na<sup>+</sup> indépendants (familles CTL et OCT) plutôt que le transporteur à haute affinité Na<sup>+</sup> dépendant CHT1 (Michel et al. 2006 ; Kummer et al. 2008). Des données récentes suggèrent fortement l'existence du système cholinergique non neural chez les cnidaires (activité AChE localisée dans l'endoderme des bulbes tentaculaires de la méduse *Clytia hemisphaerica*, Denker et al. 2008b ; et dans les cellules épithéliales endodermiques et ectodermiques du polype d'hydre, Takahashi & Hamaue 2010). De même, chez le cténaire *Beroe ovata*, Hernandez-Nicaise (1974) a observé une réaction positive au test d'activité de l'AChE dans des cellules non neurales, notamment au niveau de l'apex des coussinets des peignes et dans des cellules dispersées au niveau des canaux endodermiques.

A la différence de la plupart des autres composants moléculaires du système cholinergique, le transporteur CHT semble présenter une spécificité neuronale marquée chez les Bilateria. L'expression de CHT semble spécifiquement neuronale chez le nématode *C. elegans* (Okuda et al. 2000 ; Matthies et al. 2006). Chez un lépidoptère, des expériences de RT-PCR montrent que l'expression de CHT est restreinte aux tissus nerveux à l'exclusion des autres types de tissus (p. ex. épiderme, tube digestif, muscles, gonades... ; McLean et al. 2005). Curieusement, il n'existe pas données sur la drosophile. Chez les vertébrés, le transporteur à haute affinité de la choline a été considéré comme spécifique du système nerveux, mais Haberberger et al. (2002) ont montré par RT-PCR et immunofluorescence qu'il est également exprimé dans des cellules épithéliales non neurales de la peau de l'homme et du rat (les kératinocytes et les cellules de la gaine des poils), et serait impliqué dans leur différenciation. Puis en 2003, la même équipe a montré que la protéine CHT1 est présente dans les cellules épithéliales ciliées de la trachée du rat (Pfeil et al. 2003), où elle co-localise avec ChAT (voir schéma de la sécrétion cholinergique dans l'épithélium respiratoire de mammifère, Fig. 48). Ces quelques cas connus de fonctions non neurales de CHT pourraient représenter une situation dérivée propre aux mammifères, ou au contraire une implication plus ancienne du transporteur à haute affinité de la choline à la fois dans le contexte synaptique et dans certains contextes non synaptiques.

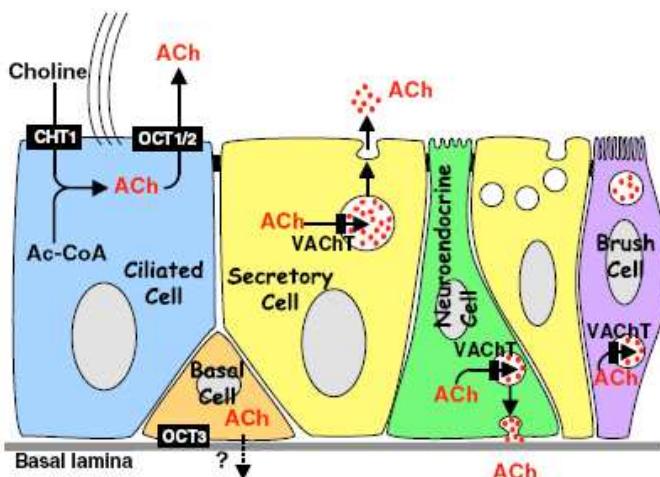


Figure 48. La sécrétion d'acétylcholine au niveau d'un épithélium de voie respiratoire chez un mammifère. Noter que dans les cellules ciliées, la choline est transportée par **CHT1**. **OCT** : transporteur de cations organiques (*organic cation transporter*), **VACHT** : transporteur vésiculaire de l'acétylcholine. Figure issue de Kummer et al. (2008).

Ce chapitre rend compte de la recherche d'orthologues de CHT chez le cténaire *Pleurobrachia pileus*, ainsi que chez plusieurs espèces représentatives des principales lignées de Bilateria et de non-Bilateria. Un premier objectif de cette étude était de clarifier l'histoire évolutive du transporteur CHT : a-t-il été acquis chez les Bilateria, les eumétazoaires, les métazoaires, plus anciennement ?

Dans un deuxième temps, les deux paralogues de CHT identifiés chez *P. pileus* ont fait l'objet d'une étude d'expression chez l'adulte. L'objectif était de préciser la nature et la distribution des cellules

exprimant CHT chez le cténaire, notamment pour déterminer si ce transporteur est spécifiquement associé à des cellules nerveuses ou non. La neurotransmission étant une innovation des eumétazoaires, alors que la communication intercellulaire utilisant l'acétylcholine est d'origine plus ancienne que les métazoaires, une hypothèse possible serait que l'apparition du transporteur CHT soit corrélée à l'invention de la synapse cholinergique. Une expression strictement neuronale de CHT chez le cténaire appuierait cette hypothèse. Par ailleurs, l'identification de cellules nerveuses exprimant CHT serait un argument fort pour confirmer l'existence de la transmission synaptique cholinergique chez un non-Bilateria.

## Matériels et Méthodes

### Recherche de séquences similaires à CHT et analyse phylogénétique

La séquence protéique humaine de CHT1 (numéro d'accès GenBank AB043997) a été utilisée pour réaliser des recherches en tBlastn (E-value seuil = 1.0) sur les collections de séquences suivantes :

- ESTs de *Pleurobrachia pileus* séquencés en 5' par la méthode de Sanger par le Genoscope (Evry) (env. 36 000 ESTs), assemblés en utilisant Phrap (contigs + singltons = 8936 séquences).
- ESTs de *Pleurobrachia pileus* séquencés en 454 par GATC en juillet 2010 (env. 1 million de lectures) assemblés par Newbler (contigs + singltons = 79136 séquences) ; données non disponibles publiquement pour le moment.
- ESTs de *Clytia hemisphaerica* (cnidaire, hydrozoaire) séquencés en 5' par la méthode de Sanger au Genoscope (env. 86 000 ESTs), complétés par des séquençages « full length » puis assemblés par Phrap (contigs + singltons = 18800 séquences).
- Bases de données NCBI (refseq mRNA, genomes, ESTs) pour les taxons suivants : Deutérostomiens : *Homo sapiens*, *Strongylocentrotus purpuratus* (échinoderme, oursin) ; Ecdysozoaires : *Drosophila melanogaster* (arthropode, hexapode), *Limulus polyphemus* (arthropode, chélicérate), *Caenorhabditis elegans* (nématode) ; Lophotrochozoaires : *Capitella capitata* (annélide, polychète), *Helobdella robusta* (annélide, hirudinée), *Lottia gigantea* (mollusque, céphalopode) ; Cnidaires : *Nematostella vectensis* (anthozoaire), *Hydra magnipapillata* (hydrozoaire) ; Placozoaires : *Trichoplax adhaerens* ; Spongiaires : *Amphimedon queenslandica* ; Choanoflagellés : *Monosiga brevicollis* ; Champignons (Fungi) : *Ustilago maydis* et *Aspergillus nidulans*.
- Données brutes du génome de l'éponge *Amphimedon queenslandica* téléchargées sur le site de JGI. Les séquences nucléotidiques récupérées par tblastn sur ces données ont été assemblées *a posteriori* en utilisant le programme CAP3 (accès en ligne sur <http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=cap3>).

Ces séquences ont été utilisées pour constituer un alignement en acides aminés, réalisé automatiquement par ClustalW (sous BioEdit, Hall 1999) puis corrigé à la main sous SeaView (Galtier et al. 1996). Les zones ambiguës de l'alignement ont été retirées manuellement pour donner un alignement final de 426 positions. Les analyses phylogénétiques en ML ont été effectuées sous

PhyML (Guindon & Gascuel 2003) avec le modèle WAG + 4Γ + I et la robustesse statistique évaluée par 100 réplicats de bootstraps.

### **Analyse de l'expression des gènes dans l'adulte de *Pleurobrachia pileus***

Les protocoles pour la récolte des animaux, la fixation, la synthèse des sondes ARN anti-sens, les hybridations *in situ* et leur exploitation sont les mêmes que ceux présentés dans l'article 1.

Pour la synthèse des sondes, les clones suivants ont été utilisés :

*PpiCHT1* : SQ0AAA18YB12RM1

*PpiCHT2* : SQ0AAA12YB07RM1

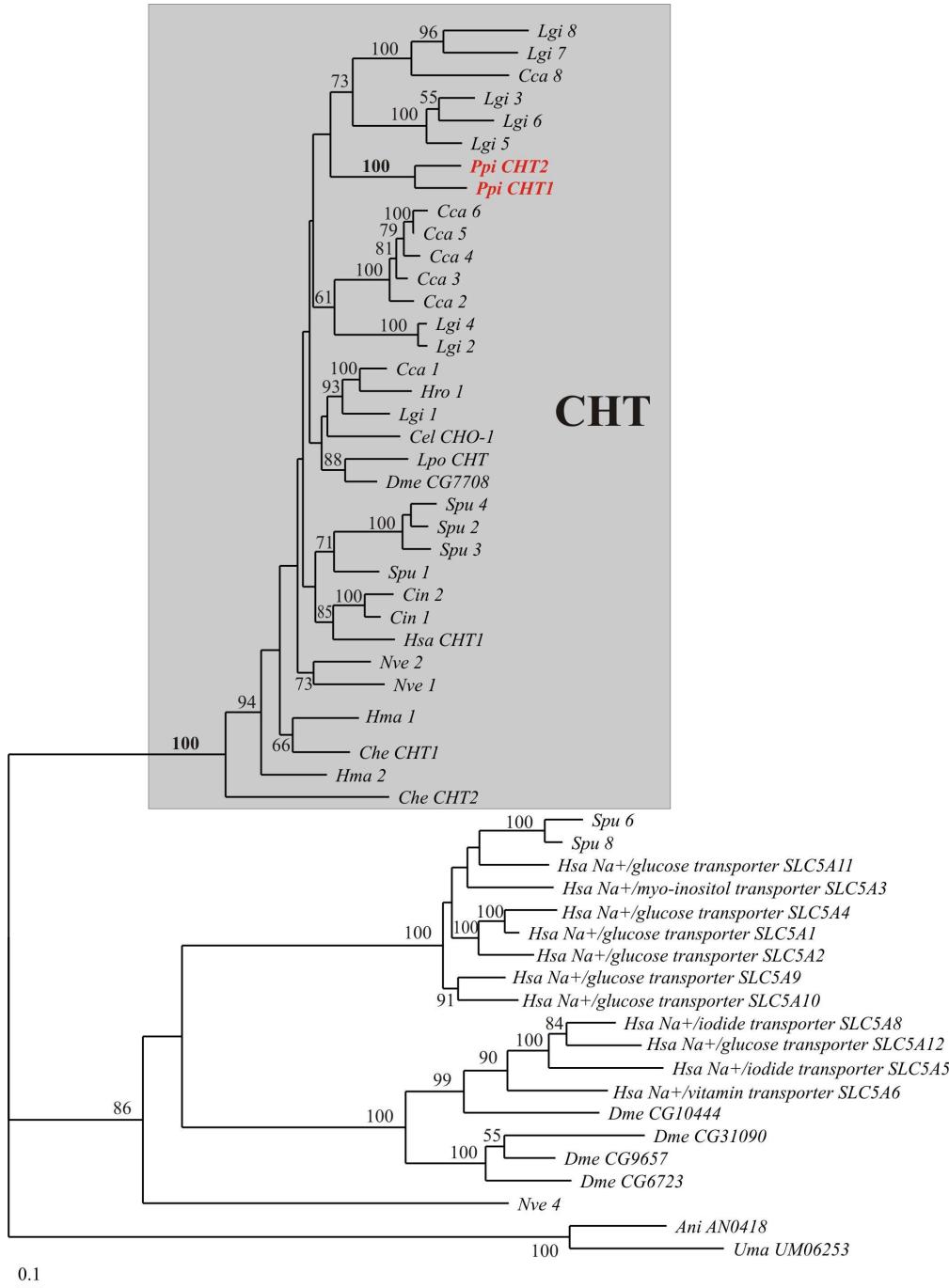
Les données sur l'expression de β-tubuline (*Ppiβ-tub*) et d'une chaîne lourde la myosine du groupe b (*PpiMHCb1*) ont été aimablement fournies par Cyrielle Dayraud qui a également réalisé les analyses phylogénétiques établissant l'orthologie de ces séquences.

## Résultats

### Analyse phylogénétique

Chez l'homme, CHT1 fait partie d'une famille multigénique de co-transporteurs à Na+ comprenant les différents transporteurs Na+/glucose, Na+/iodure, Na+/vitamine et Na+/myo-inositol (Fig. 49). Dans l'analyse phylogénétique de cette famille multigénique, les orthologues chez différents animaux de la séquence CHT1 humaine forment la famille CHT, dont la monophylie est fortement soutenue (valeur de bootstrap : 100%).

Cette famille CHT semble propre aux eumétazoaires. Les recherches par Blast ont permis d'identifier des orthologues indubitables de CHT chez toutes les espèces testées de Bilateria et de cnidaires. Par ailleurs, deux séquences du cténaire *Pleurobrachia pileus* (nommées *PpiCHT1* et *PpiCHT2*) se groupent ensemble au sein de la famille CHT. En revanche, aucune séquence similaire à CHT n'a été obtenue en blastant les génomes du choanoflagellé *Monosiga brevicollis* et du placozoaire *Trichoplax adhaerens*. En ce qui concerne l'éponge *Amphimedon queenslandica*, au moment où ce chapitre a été écrit (septembre 2010), il n'était toujours pas possible d'effectuer des recherches par Blast sur le génome assemblé et annoté, ni sur NCBI ni sur JGI (Joint Genome Institute, qui a réalisé le séquençage de cette espèce), alors que ce génome a été publié en août 2010 (Srivastava et al. 2010) et que les données brutes non assemblées issues du séquençage sont téléchargeables depuis au moins trois ans. Des recherches par tBlastn réalisées sur ces données téléchargées n'ont permis de détecter qu'une seule séquence présentant une vague similitude avec CHT, mais après vérification sur NCBI cette séquence s'est avérée appartenir au génome d'une bactérie. Ceci suggère que le génome de l'éponge ne contiendrait pas d'orthologue de CHT. En conclusion, la protéine CHT ne semble exister que chez les cténaires, cnidaires et Bilateria et constituerait donc une innovation des eumétazoaires.



**Figure 49.** Arbre des co-transporteurs à  $\text{Na}^+$ , obtenu en Maximum de Vraisemblance à partir des séquences protéiques. Pour ne pas surcharger l'arbre, les séquences non-CHT n'ont été incluses dans cette analyse que pour l'homme, la drosophile, l'oursin, les cnidaires. La racine est représentée par deux séquences de champignons (*Ani* : *Aspergillus nidulans* ; *Uma* : *Ustilago maydis*). En l'absence de nom ou de numéro de code disponibles dans les bases de données, les gènes sont désignés par des numéros arbitraires placés après les abréviations de noms d'espèces. Les valeurs de bootstrap associées aux différentes branches sont indiquées lorsqu'elles sont supérieures à 50%. Abréviations des noms d'espèces : **Cca** : *Capitella capitata* (annélide) ; **Cel** : *Caenorhabditis elegans* (nématode) ; **Che** : *Clytia hemisphaerica* (cnidaire, hydrozoaire) ; **Cin** : *Ciona intestinalis* (urochordé) ; **Dme** : *Drosophila melanogaster* (arthropode) ; **Hma** : *Hydra magnipapillata* (cnidaire, hydrozoaire) ; **Hro** : *Helobdella robusta* (annélide) ; **Hsa** : *Homo sapiens* ; **Lgi** : *Lottia gigantea* (mollusque) ; **Lpo** : *Limulus polyphemus* (arthropode) ; **Nve** : *Nematostella vectensis* (cnidaire, anthozoaire) ; **Ppi** : *Pleurobranchia pileus* (cténaire) ; **Spu** : *Strongylocentrotus purpuratus* (échinoderme).

Situation peu habituelle, il existe un seul paralogique pour cette famille CHT dans le génome humain (CHT1), alors que la plupart des autres espèces échantillonnées pour lesquelles on dispose d'un génome complet ont plusieurs paralogues, à l'exception de la drosophile et du nématode *C. elegans*. Lorsque différents paralogues CHT sont présents pour une même espèce, ils sont parfois groupés ensemble (cas de l'oursin, de la cione, de l'anémone de mer, de *Pleurobranchia pileus*), indiquant que les duplications ayant donné ces paralogues sont propres à la lignée de l'espèce considérée, et parfois au contraire dispersés au sein du clade CHT. En particulier, on identifie trois clades différents contenant à la fois des gènes de mollusque (*Lottia gigantea*) et d'annélide (*Capitella capitata*), ce qui suggère l'existence de trois paralogues CHT chez l'ancêtre commun des mollusques et des annélides. Les relations entre ces gènes de mollusques et d'annélides et ceux des autres taxons suggèrent que ces duplications ne sont pas plus anciennes que les lophotrochozoaires. Toutefois, selon cette hypothèse, l'ensemble des gènes de lophotrochozoaires devrait former un clade, ce qui n'est pas le cas dans l'arbre. Mais comme les nœuds profonds au sein du clade CHT ne sont pas soutenus, la monophylie des séquences de lophotrochozoaires n'est pas exclue. En conclusion, le pattern phylogénétique suggère la présence d'un seul membre de la famille CHT chez l'ancêtre commun des eumétazoaires ainsi que chez celui des Bilateria.

La distribution dans l'arbre des gènes d'hydrozoaires (*Hydra magnipapillata*, *Hma*; et *Clytia hemisphaerica*, *Che*) est assez curieuse. Ces gènes ne forment pas un groupe monophylétique avec les deux paralogues de l'anémone de mer *Nematostella vectensis*, et se positionnent à la base du clade CHT. Comme ce positionnement ne fait pas de sens d'un point de vue phylogénétique, il est probablement attribuable à une attraction de longue branche et donc à une forte divergence de ces séquences d'hydrozoaires. L'un des paralogues d'hydre se groupe avec l'un des paralogues de *Clytia* (appelé *CheCHT1*), mais l'autre parologue de *Clytia* (*CheCHT2*) est placé en groupe-frère de tous les autres CHT, l'autre gène d'hydre occupant lui-même une position basale au sein de ce dernier clade. Il est probable que *CheCHT2* et le deuxième gène d'hydre soit orthologues, et que la présence de deux paralogues chez les hydrozoaires soit le résultat d'une duplication propre à ce groupe, mais cela n'est pas apparent dans la topologie de l'arbre, probablement à cause de la forte divergence de ces séquences. L'inclusion d'autres séquences d'hydrozoaires (actuellement inexistantes dans les bases de données) pourrait permettre de clarifier ce point dans l'avenir.

## **Expression des gènes *PpiCHT1* et *PpiCHT2* dans l'adulte de *Pleurobrachia pileus***

### *Expression localisée de PpiCHT1 dans des structures de l'épithélium ectodermique*

Chez l'adulte de *Pleurobrachia pileus*, *PpiCHT1* est exprimé en plusieurs sites de l'ectoderme. Le site d'expression le plus évident lorsqu'on observe les spécimens *in toto* (Fig. 50A) est situé au niveau des peignes. *PpiCHT1* est exprimé au niveau de chacun des peignes, sous forme de spots irréguliers répartis sur le pourtour du coussinet basal du peigne (Fig. 50B). Certains peignes présentent aussi un marquage de leur extrémité, à l'emplacement des cellules souches (Fig. 50F). Sur une coupe transversale d'un peigne (Fig. 50C, D), il apparaît que les cellules marquées sont de deux types : des cellules épithéliales constituant le revêtement du coussin basal (c'est-à-dire la couche épithéliale qui recouvre les corps cellulaires des polster cells) et certaines polster cells. Dans la majorité des cas, les polster cells marquées sont les plus extérieures par rapport au plan de symétrie du peigne, autrement dit les plus superficielles (Fig. 50D).

Au niveau du complexe sensoriel aboral, *PpiCHT1* est exprimé dans quatre zones symétriques autour de l'organe apical (Fig. 50E, flèches noires). Les cellules marquées sont localisées dans la partie proximale de la région marginale des champs polaires (voir Fig. 50E et le contre-DAPI Fig. 50E'). Les quatre taches de marquage *PpiCHT1* sont donc tout à fait distinctes des quatre pools de cellules souches identifiés dans l'article 1 (dont l'emplacement indiqué par des points rouges dans les Fig. 50E et E'), situés dans la partie proximale de la zone centrale des champs polaires. D'après leur position, ces cellules exprimant *PpiCHT1* sont certainement des cellules épithéliales ciliées, peut-être de nature sensorielle.

Dans l'épithélium général, la coloration se présente sous forme de structures rondes dispersées (non montrées), similaires au bruit de fond que donnent habituellement les cellules glandulaires sur les hybridations *in situ* de *Pleurobrachia*. Nous n'avons pas détecté de cellules épithéliales marquées dont la morphologie évoquerait celle d'un neurone.

### *Expression de PpiCHT1 associée à la gonade*

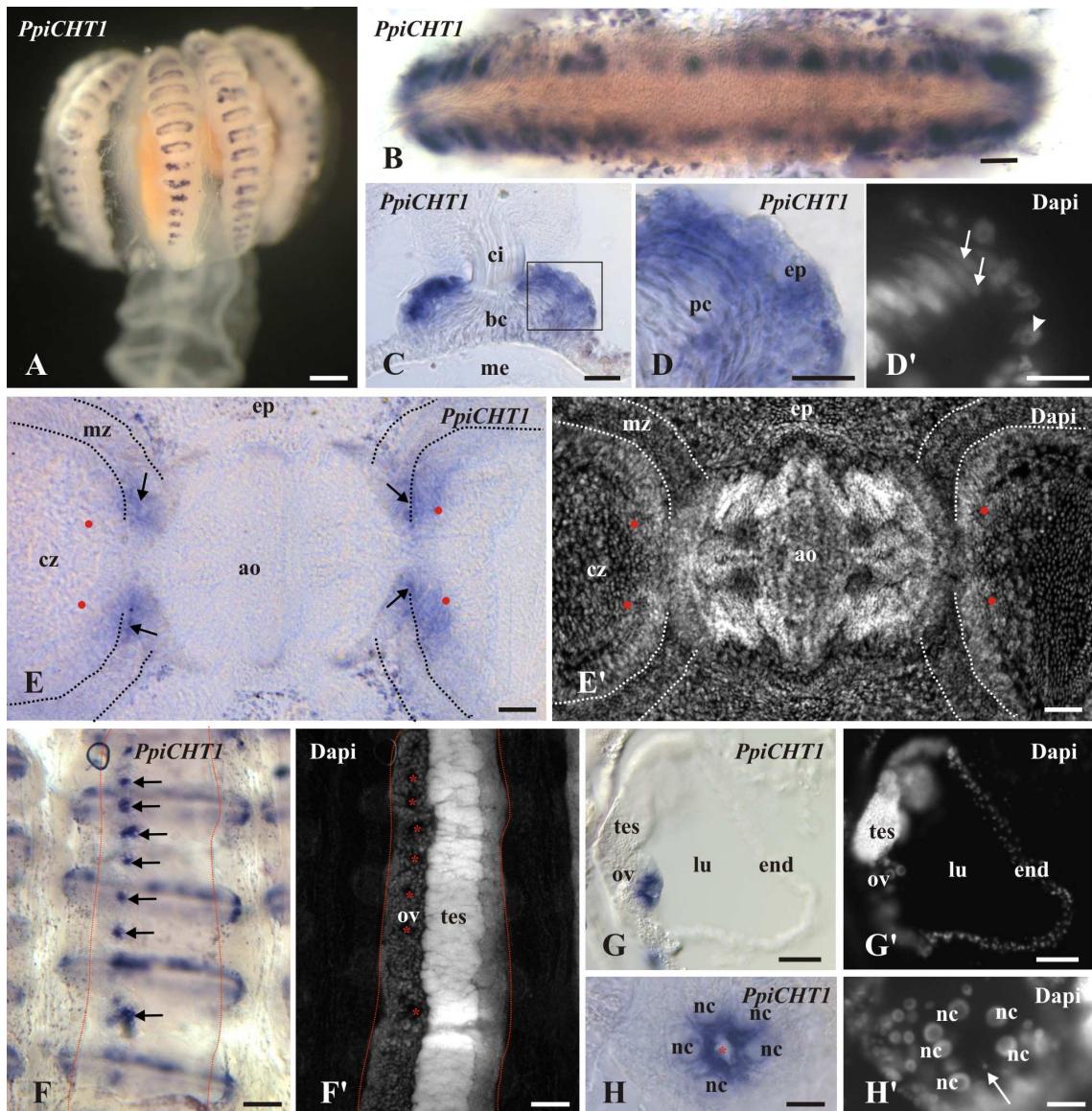
*PpiCHT1* est également exprimé dans les gonades femelles (mais non dans les gonades mâles). *In toto*, le marquage apparaît sous forme de spots distribués le long de la gonade femelle (Fig. 50F : attention superposition d'un canal méridien et d'une rangée de peignes ; voir le contre-DAPI Fig. 50F'). Le marquage apparaît très localisé, associé à des ovocytes en cours d'accroissement (reconnaissables à la présence d'une tache de vitellus, non marquée, ne remplissant pas tout le cytoplasme, et à leur petit

noyau) (Fig. 50G, H). A fort grossissement, on distingue également un marquage dans les cellules nourricières (qui possèdent un gros noyau) entourant l'ovocyte (Fig. 50H). Il semble que seule une faible proportion des ovocytes présents dans la gonade exprime *PpiCHT1* : à chaque niveau de coupe, on observe au maximum un ovocyte marqué.

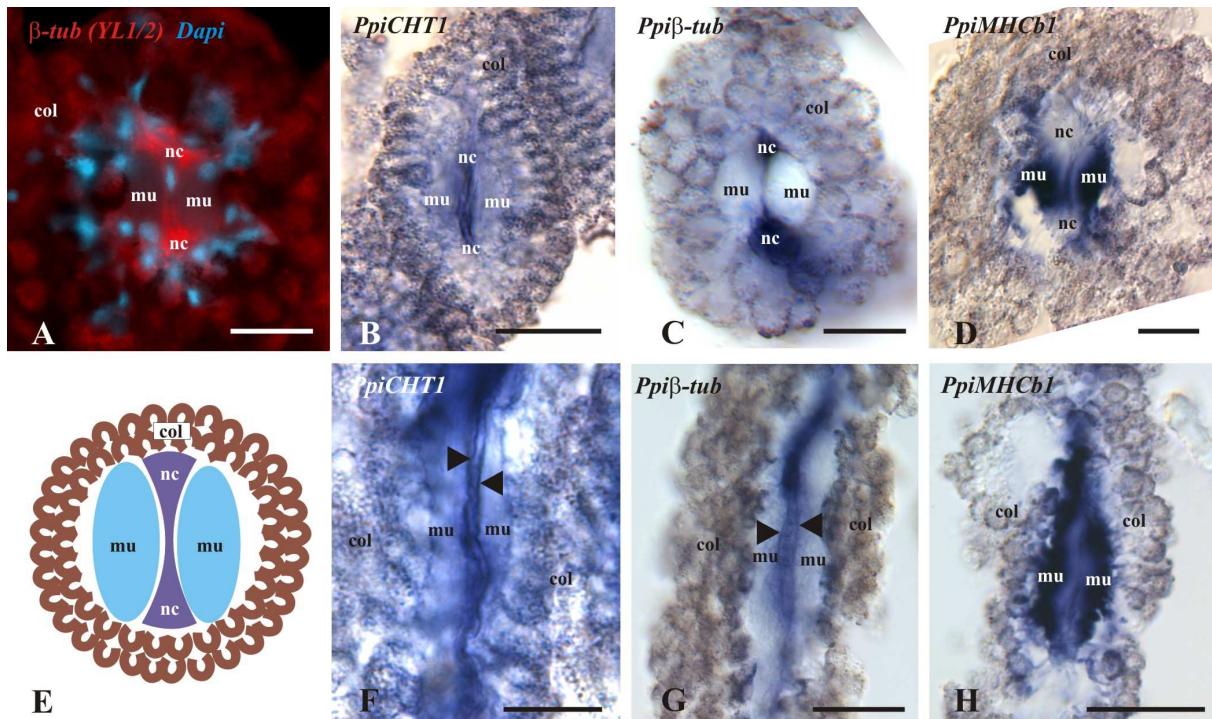
#### *Expression de PpiCHT1 associée au système nerveux dans le système tentaculaire*

*PpiCHT1* est exprimé dans les cordons nerveux des tentilles, dans le tentacule et dans la racine tentaculaire. Nous appréhendons encore difficilement la complexité de l'appareil tentaculaire, par conséquent l'assignation d'un type cellulaire aux cellules CHT-positives est assez délicate. Dans les coupes cryogéniques de tentilles, les transcrits sont détectables dans des cellules d'aspect allongé, prises en sandwich entre deux masses non marquées (Fig. 51B en coupe transversale légèrement oblique ; Fig. 51F en coupe longitudinale). Ce marquage *PpiCHT1* est très semblable à celui obtenu avec une sonde anti-sens pour la  $\beta$ -tubuline (Fig. 51C, G). Une coupe transversale après marquage avec l'anticorps YL1/2 (anti- $\beta$ -tubuline-tyrosylée) révèle au même emplacement la présence de deux cordons nerveux, localisés en périphérie de la mésoglée sous les colloblastes, et reliés par des connections transverses (Fig. 51A). Les deux masses claires encadrant la zone marquée dans les *in situ* *PpiCHT1* et  $\beta$ -tubuline et l'immunofluorescence YL1/2 correspondent à la musculature du tentille, comme le démontre leur marquage intense avec une sonde antisens pour la myosine MHCb1 (orthologue de la chaîne lourde de myosine du muscle strié des Bilateria) (Fig. 51D, H). Ces données suggèrent fortement que *PpiCHT1* est exprimé dans les cordons nerveux du tentille, dont l'organisation en coupe transversale est schématisée dans la figure 51E.

Au niveau de l'axe du tentacule (T dans la Fig. 52), le marquage *PpiCHT1* apparaît sous forme de deux croissants périphérique et symétriques (Fig. 52E). Les cellules marquées sont localisées dans la mésoglée sous l'épithélium du tentacule. Nos observations en immunofluorescence avec l'anticorps YL1/2 (voir article 4 en Annexe 1, Fig. 2E, E') nous ont permis d'identifier deux cordons nerveux tentaculaires ayant une localisation similaire à celle du marquage *PpiCHT1*. On peut donc raisonnablement supposer que ce gène est exprimé dans des cellules nerveuses du tentacule.



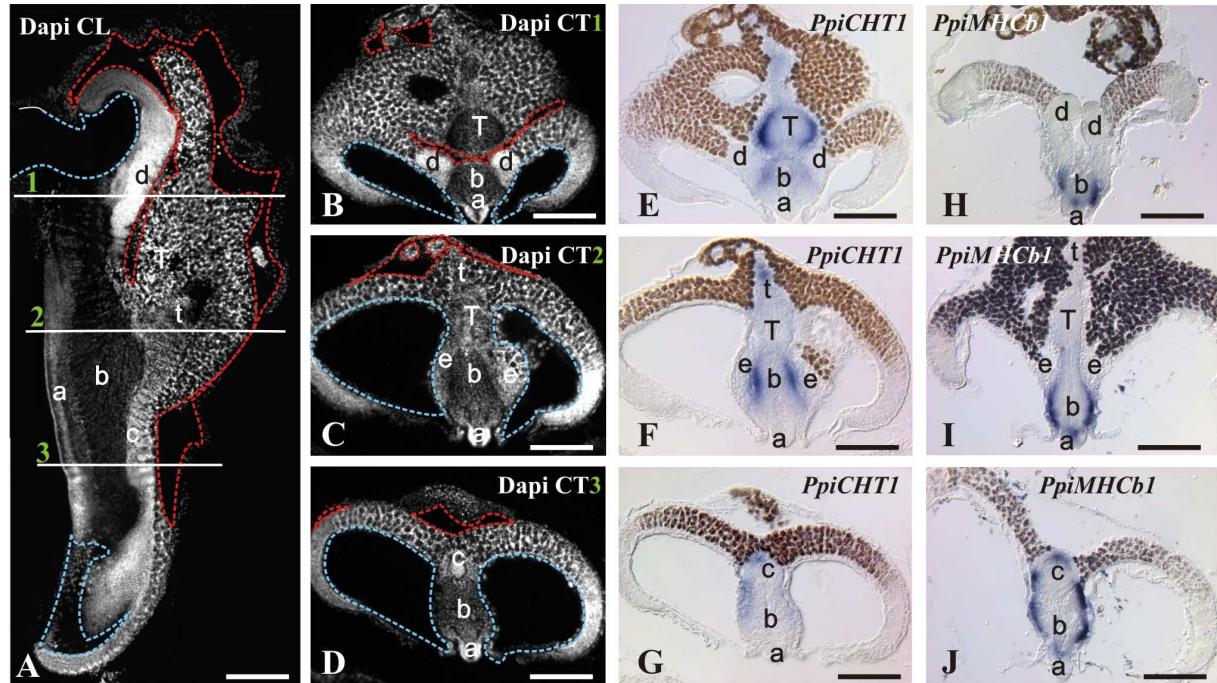
**Figure 50.** Expression de *PpiCHT1* dans les rangées de peignes, le complexe sensoriel aboral et les canaux méridiens. **(A)** Spécimen *in toto* montrant l'expression de *PpiCHT1* au niveau des coussinets basaux des peignes. **(B)** Gros plan du coussinet basal d'un peigne. **(C)** Cryosection transversale d'un peigne. **(D)** Gros plan de la zone encadrée dans (C), montrant l'expression de *PpiCHT1* dans les polster cells (**pc**) les plus superficielles et dans des cellules de la couverture épithéliale du coussinet basal (**ep**). **(D')** Contre-marquage au Dapi de l'image montrée en (D). Les flèches blanches indiquent des noyaux de polster cells ; la tête de flèche blanche indique un noyau de cellule épithéliale. **(E)** Expression de *PpiCHT1* dans la partie proximale des champs polaires. Les flèches noires indiquent les quatre zones de marquage, situées dans la portion proximale de la zone marginale (**mz**) des champs polaires, tout près de l'organe apical (**ao**). **(E')** Contre-marquage au Dapi de l'image montrée en (E). Les points rouges en (E) et (E') indiquent la position approximative des quatre groupes de cellules souches identifiées dans l'article 1, repérés d'après la distribution des noyaux sur l'image au Dapi (E'). **(F)** Expression de *PpiCHT1* en taches isolées (flèches noires) au niveau d'un canal méridien (superposé ici à une rangée de peignes). **(F')** Contre-marquage au Dapi de l'image montrée en (F), permettant de distinguer la région de l'ovaire (**ov**) et celle du testicule (**tes**). Les pointillés en (F) et (F') soulignent les bords du canal méridien. Les astérisques rouges en (F') correspondent aux taches marquées dans l'image (F). **(G)** Cryosection transversale d'un canal méridien montrant une tache isolée de marquage *PpiCHT1* dans l'ovaire. **(G')** Contre-marquage au Dapi de l'image (G). **(H)** Gros plan montrant que le marquage ovarien correspond à un ovocyte (dont la masse centrale de vitellus est indiquée par l'astérisque rouge) et aux cellules nourricières (**nc**) qui l'entourent. **(H')** Contre-marquage au Dapi de l'image (H). La flèche blanche indique le noyau de l'ovocyte. **ao** : organe apical, **bc** : coussinet basal, **ci** : cils des polsters cells, **cz** : zone centrale du champ polaire, **end** : épithélium endodermique du canal méridien, **ep** : cellules épithéliales, **lu** : lumière du canal méridien, **me** : mésoglée, **mz** : zone marginale du champ polaire, **nc** : cellules nourricières, **ov** : ovaire, **pc** : polster cells, **tes** : testicule. Barres d'échelle : A : 150 µm, B, C : 20 µm, D, D', H, H' : 10 µm, E, E' : 25 µm, F, F', G, G' : 50 µm.



**Figure 51.** Comparaison de l'expression dans les tentilles de *PpiCHT1*, d'un marqueur du système nerveux (*Ppi $\beta$ -tub* =  $\beta$ -tubuline) et d'un marqueur musculaire (*PpiMHCb1* = chaîne lourde de la myosine du groupe b). **(A-D)** Cryosections de tentilles en coupe transversale (noter que la coupe B est légèrement oblique). **(A)** Marquage immunofluorescent avec l'anticorps anti- $\beta$ -tubuline tyrosylée (YL1/2, en rouge) et marquage des noyaux au Dapi (en bleu). Le marquage YL1/2 met en évidence deux cordons nerveux (nc) reliés par une connexion transverse. **(B)** Expression de *PpiCHT1* au niveau des cordons nerveux et de leur connexion. **(C)** Expression de *Ppi $\beta$ -tub* également au niveau des deux cordons nerveux. **(D)** Expression de *PpiMHCb1* au niveau des deux masses musculaires (mu). **(E)** schéma récapitulant l'organisation du tentille en coupe transversale. **(F-H)** Cryosections longitudinales de tentilles. **(F)** Expression de *PpiCHT1* dans les deux cordons nerveux (indiqués par les têtes de flèches). **(G)** Expression de *Ppi $\beta$ -tub* également dans les deux cordons nerveux (têtes de flèches). **(H)** Expression de *PpiMHCb1* dans les deux muscles longitudinaux (mu). **col** : collabolastes, **mu** : muscles, **nc** : cordons nerveux. Barres d'échelle : A, C, D : 40  $\mu$ m ; B, G, H : 100  $\mu$ m ; F : 70  $\mu$ m. Remerciement à Cyrielle Dayraud qui a fourni les images d'hybridation *in situ* *Ppi $\beta$ -tub* et *PpiMHCb1* issues de son travail de thèse.

Le marquage dans la racine tentaculaire est beaucoup plus délicat à interpréter (voir § 1.1.4. pour une description morphologique de la racine tentaculaire). Il faut distinguer un marquage associé à la zone de formation de l'axe du tentacule (b) et un marquage associé à la zone de formation des tentilles (c) (Fig. 52E, F, G). Dans le premier cas, on observe un marquage en deux taches allongées symétriques (b, Fig. 52F), qui évoque le marquage dans l'axe du tentacule mature (T, Fig. 52E), et l'on peut supposer qu'il s'agit de cellules nerveuses en formation. Cependant, le marquage *PpiCHT1* dans cette zone b est assez similaire à celui que donne la myosine MHCb1 (b, Fig. 52H, I, J). En réalité, la crête médiane (a dans toutes les images de la Fig. 52) est supposée contenir à la fois les cellules souches des cellules mésoglénées musculaires et nerveuses. Alors que la myogenèse dans la racine tentaculaire est relativement bien comprise (voir « Supplementary Data » Fig. S5 de l'Article 1), ce n'est pas le cas de la neurogenèse. Il se pourrait que myogenèse et neurogenèse ne soient pas spatialement ségrégées

au sein la racine tentaculaire, ou bien (ce qui paraît moins vraisemblable) que *PpiCHT1* soit exprimé dans les cellules musculaires en cours de différenciation. En ce qui concerne le marquage dans la zone de formation des tentilles (c, Fig. 52G), l'interprétation n'est pas plus aisée, mais on peut supposer qu'il s'agit de stades immatures des cellules marquées dans les tentilles formés (Fig. 51B, F).



**Figure 52.** Expression de *PpiCHT1* et de *PpiMHCb1* (chaîne lourde de la myosine du groupe b) dans la racine tentaculaire. (A) Cryosection longitudinale de la racine tentaculaire marquée au Dapi, montrant son organisation. Le pôle aboral est vers le haut et le pôle oral vers le bas. La face interne est vers la gauche, la face externe vers la droite. (B-D) Cryosections transversales marquées au Dapi, correspondant aux trois niveaux de coupe indiquées sur l'image (A). (B) Coupe au niveau 1, dans la région aborale de la racine tentaculaire. (C) Coupe au niveau 2, dans la région moyenne. (D) Coupe au niveau 3, dans la région orale. (E, F, G) Cryosections transversales après hybridation *in situ* avec la sonde antisens *PpiCHT1*, respectivement aux niveaux 1, 2 et 3 indiqués en (A). (H, I, J) Cryosections transversales après hybridation *in situ* avec la sonde antisens *PpiMHCb1*, respectivement aux niveaux 1, 2, et 3 indiqués en (A). a : crête médiane, b : zone de formation de l'axe du tentacule, c : zone de formation des tentilles, d : masses aborales externes (voir article 1), e : portion d'épithélium en continuité avec l'épithélium des colloblastes, t : tentilles, T : tentacule. Barres d'échelle : 200 µm. Remerciement à Cyrielle Dayraud qui a fourni les images d'hybridation *in situ* *PpiMHCb1* issues de son travail de thèse.

#### *PpiCHT2* est exprimé dans l'ensemble de l'épithélium du système gastrovasculaire

Le paralogue *PpiCHT2* présente un patron d'expression radicalement différent de celui de *PpiCHT1*. Un marquage intense a été obtenu dans l'ensemble des canaux endodermiques constituant le système gastrovasculaire, ainsi que dans la paroi du pharynx qui est d'origine ectodermique (Fig. 53). Aucun autre site d'expression n'a été observé pour ce gène.

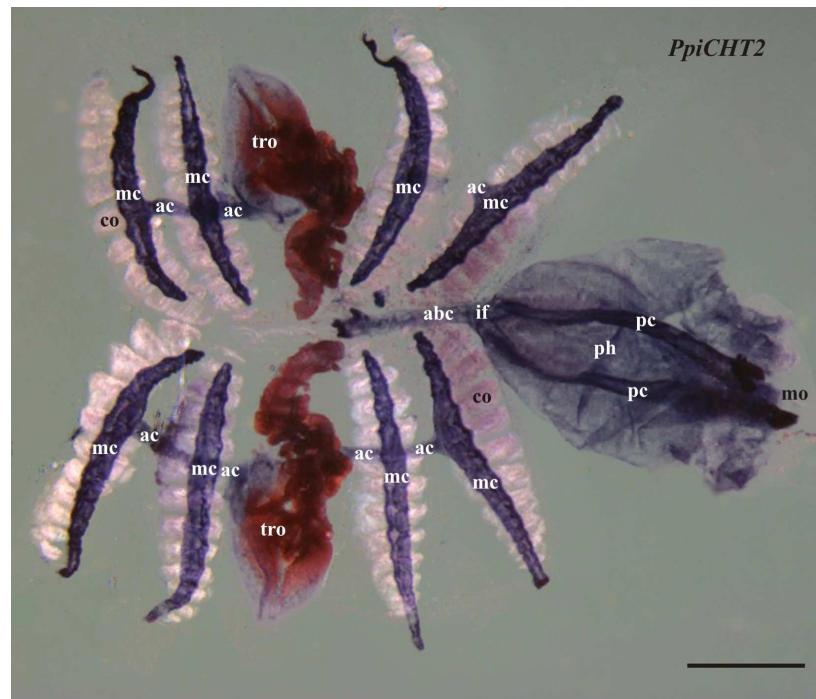


Figure 53. Expression de *PpiCHT2*. L'image montre un individu *in toto* après dissection pour mettre en évidence les différents canaux du système gastrovasculaire, où s'exprime le gène. **abc** : canal aboral, **ac** : canal adradial, **co** : peigne, **if** : infundibulum, **mc** : canal méridien, **pc** : canal paragastrique, **ph** : pharynx, **tro** : racine tentaculaire.

## Discussion

Le transporteur à haute affinité de la choline semble avoir été acquis dans la branche commune des eumétazoaires, niveau de l'arbre des métazoaires également caractérisé par l'acquisition des cellules nerveuses et des cellules musculaires (voir § 1.2.2.-C et 3.1.1. Fig.35). C'est ce qu'indique l'analyse phylogénétique des séquences des co-transporteurs à Na<sup>+</sup> (Fig. 49), ainsi que l'échec rencontré dans la recherche de séquences similaires à CHT dans les génomes de placozoaire, d'éponge et de choanoflagellé. Le transporteur CHT est probablement issu de la duplication, chez un ancêtre exclusif des eumétazoaires, d'un gène ancestral qui a donné d'un côté CHT, et de l'autre côté un gène ancêtre de l'ensemble des co-transporteurs Na+/glucose, iodure et vitamine des Bilateria. Ce scénario est soutenu par l'existence d'une séquence d'anémone de mer (*Nve 4* dans l'arbre Fig. 49) placée en groupe-frère de tous ces co-transporteurs Na+ de Bilateria autres que CHT.

Dans l'état actuel de la littérature, on dispose de peu d'éléments pour comparer l'histoire du transporteur CHT avec celle des autres composants du système cholinergiques (autres transporteurs de la choline, transporteur vésiculaire, enzymes de biosynthèse et de dégradation). En effet, il n'existe pas d'études phylogénétiques concernant ces différentes familles de protéines. Dans le cas des acétylcholinestérases (AChE), on sait depuis longtemps qu'il existe chez les plantes des enzymes hydrolysant l'acétylcholine et sensibles aux mêmes inhibiteurs que l'AChE animale. Toutefois, le clonage de ces AChE chez plusieurs angiospermes a révélé qu'elles ne présentent pas de similitude de séquences avec les AChE animales et appartiennent à une famille enzymatique différente (Sagane et al. 2005 ; Yamamoto et al. 2008). L'origine des AChE animales reste donc obscure. Nous avons réalisé des analyses préliminaires de la phylogénie des enzymes de biosynthèse de l'acétylcholine (résultats non montrés). Les arbres indiquent que la duplication ayant donné la choline acétyltransférase (ChAT) et la carnitine acétyltransférase (CRAT) est propre aux Bilateria, et que les cnidaires, cténaires mais aussi l'éponge possèdent des orthologues du clade (ChAT + CRAT). L'histoire de ces enzymes de biosynthèse semble donc bien différente de celle de CHT. Une étude systématique de la phylogénie des différents composants du système serait en mesure d'apporter un éclairage précieux sur l'évolution de la transmission cholinergique chez les animaux.

*Pleurobrachia pileus* possède deux paralogues *PpiCHT1* et *PpiCHT2*, clairement issus d'une duplication propre aux cténaires. Ces deux gènes, d'abord identifiés dans la collections de 36 000 ESTs séquencés en Sanger, ont été retrouvés dans les nouvelles données de séquençage du

transcriptome en 454 (un million de lectures), sans que de nouveaux paralogues puissent être identifiés. Il n'existe donc probablement pas d'autre parologue de CHT chez *P. pileus*, même si cela reste à confirmer par le séquençage du génome complet. Les paralogues *PpiCHT1* et *PpiCHT2* présentent des patrons d'expression radicalement différents dans l'adulte de *Pleurobrachia pileus*, indiquant que cette duplication a été suivie d'une forte spécialisation fonctionnelle.

Les données d'expression obtenues chez *P. pileus* suggèrent que chez l'ancêtre des eumétazoaires, CHT n'était pas spécifiquement lié aux neurones cholinergiques. Ce transporteur a probablement dès son origine été impliqué dans l'importation massive de choline dans des cellules aussi bien neurales que non neurales. En effet, nous avons pu identifier chez *P. pileus* des territoires d'expression clairement neuraux (cordons nerveux des tentilles, et probablement des tentacules, pour *PpiCHT1*) aussi bien que non neuraux (cellules épithéliales ectodermiques des peignes et ovocytes pour *PpiCHT1* ; cellules épithéliales endodermiques pour *PpiCHT2*). Cette situation n'est pas une particularité des cténaires puisqu'elle se retrouve chez les mammifères (Haberberger et al. 2002 ; Pfeil et al. 2003 ; Kummer et al. 2008), ainsi que chez les cnidaires (expression neurale et non neurale de paralogues CHT chez l'hydre, poster présenté au congrès *Hydra meeting*, Tutzing, Allemagne en sept. 2009 par Takahashi et al.), évoquant bien ainsi une caractéristique ancestrale des eumétazoaires. De plus, la nature des territoires d'expression non neuraux identifiés chez le cténaire *P. pileus* (au niveau d'épithéliums ciliés ecto- et endodermiques) évoque assez les territoires d'expression non neuraux de CHT1 chez les mammifères (cellules de l'épithélium ectodermique telles que les kératinocytes ; cellules endodermiques ciliées de l'épithélium de la trachée ou des bronches). Il est intéressant d'observer enfin que la spécialisation fonctionnelle entre les paralogues *PpiCHT1* et *PpiCHT2* n'est pas liée à la nature neurale ou non-neurale des cellules, mais paraît plutôt grossièrement correspondre à une distinction ectoderme (pour *PpiCHT1*, avec comme exception l'expression dans les ovocytes) / endoderme (pour *PpiCHT2*, avec comme exception l'expression dans le pharynx, d'origine ectodermique bien que fonctionnellement rattaché au système gastrovasculaire d'origine endodermique).

Les résultats tendent par ailleurs à confirmer l'existence de neurones cholinergiques chez les cténaires, suspectée il y a plus de trente ans par Hernandez-Nicaise (1974) sur la base de tests d'activité de l'AChE chez le cténaire *Beroe ovata*.<sup>22</sup> De plus, l'expression de *PpiCHT1* dans les cordons nerveux

---

<sup>22</sup> Dans le détail, les données d'expression des deux paralogues de CHT chez *P. pileus* présentent d'ailleurs certains points de concordance remarquables avec les résultats d'Hernandez-Nicaise (1974) chez *B. ovata*. En particulier, celle-ci avait observé des signaux positifs au niveau de différents types de synapses, mais également au niveau de certaines cellules non neurales, particulièrement « l'apex des coussinets des palettes » (cf. expression de *PpiCHT1* au niveau des coussinets des peignes) et « des petites plages triangulaires, qui sont soit des portions de cellules soit des espaces intercellulaires, fortement colorées, parsemant les canaux endodermiques » (cf. expression de *PpiCHT2* au niveau des canaux endodermiques).

des tentilles et des tentacules, étroitement accolés à la musculature, suggère un lien entre neurones cholinergiques et contrôle de la contraction musculaire. L'acétylcholine est très généralement impliquée dans le contrôle de la musculature par les motoneurones chez les Bilateria, et ce caractère pourrait donc remonter à l'ancêtre commun des eumétazoaires. Toutefois, des expériences supplémentaires sont bien sûr nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Il est plus délicat de formuler des hypothèses fonctionnelles à propos des autres sites d'expression. Au niveau des rangées de peignes, l'acétylcholine pourrait être impliquée dans le contrôle du mouvement des cils des poster cells et dans leur coordination, via un rôle de neuromodulateur sur le système nerveux associé aux peignes. En ce qui concerne les quatre taches aborales d'expression de *PpiCHT1*, leur signification est particulièrement énigmatique en l'état ; elle pourrait être liée à des fonctions sensorielles. L'expression apparemment transitoire de *PpiCHT1* dans les ovocytes en cours d'accroissement est également assez mystérieuse. Cette expression ne correspond certainement pas à l'accumulation d'un ARNm hérité maternellement, car si tel était le cas, le transcript devrait être détecté aussi dans les ovocytes plus matures et l'expression devrait concerner l'ensemble de la gonade femelle (comme dans le cas de Piwi, Vasa, Bruno et PL10, voir l'article 1). Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de données sur une éventuelle expression de CHT associée aux ovocytes chez les Bilateria. L'existence d'un système cholinergique non neural est documentée dans les ovaires de mammifères (Mayerhofer & Kunz 2005), mais dans ce système ce sont les cellules de la granulosa et non les ovocytes qui produisent et libèrent l'acétylcholine, et de plus il n'y a pas d'indications sur la nature du transporteur de la choline (faible, moyenne ou haute affinité) impliqué dans ce système. Une hypothèse plausible serait que l'expression transitoire de *PpiCHT1* en cours d'ovogenèse corresponde à un besoin en quantités élevées de choline pour la biosynthèse de certains constituants biochimiques (p.ex. phospholipides ?).

Les résultats obtenus ici sur les orthologues de CHT chez *Pleurobrachia pileus* ouvrent d'assez nombreuses perspectives d'approfondissement pour l'avenir. Tout d'abord, il serait judicieux de réaliser des expériences d'injection d'ovocytes de Xénope ou de cellules animales en culture avec des cDNA codant pour les protéines CHT de *Pleurobrachia*, pour vérifier leur capacité à induire l'importation de la choline et tester leur spécificité (expériences couramment réalisées pour des CHT de Bilateria, p. ex. Okuda et al. 2000, McLean et al. 2005). Il serait également intéressant d'étudier l'expression chez le céphalopode adulte d'autres composants du système cholinergique, en particulier pour vérifier si leur expression est plus ubiquitaire que celle de CHT, comme on peut le prédir d'après les données concernant les Bilateria. Une autre voie expérimentale consisterait à refaire chez *P. pileus* les expériences de détection de l'activité acétylcholinestérase que M.-L. Hernandez-Nicaise (1974) avait réalisé chez *Beroe ovata*. Des essais dans ce sens ont été réalisés au laboratoire, et ont donné des

résultats prometteurs (avec en particulier, un signal associé aux rangées de peignes), mais la spécificité de ces marquages n'est pas claire. Enfin, l'analyse de l'expression des deux paralogues CHT identifiés chez *Clytia hemisphaerica* (Fig. 49), organisme modèle également étudié dans l'équipe, serait susceptible d'apporter ou non une confirmation à la conclusion majeure tirée de la présente étude, l'existence de fonctions neurales et non neurales dès l'origine du transporteur à haute affinité de la choline, chez un ancêtre commun exclusif des eumétazoaires.

# 4

## Conclusions et perspectives

### 4.1. Rappel des principaux résultats de mon travail de thèse

Chez le cténaire *Pleurobrachia pileus*, les gènes *Piwi*, *Vasa*, *Bruno* et *PL10* sont exprimés dans la lignée germinale et dans les cellules souches, quelle que soit leur identité. Ce double rôle, vraisemblablement hérité d'un ancêtre commun aux eumétazoaires, est probablement lié au maintien de l'intégrité du génome par le système Piwi. La restriction de cet ensemble de gènes à la lignée germinale ne concerne que certains groupes modèles bilatériens (drosophile, vertébrés...). Il n'est donc pas approprié d'utiliser ces gènes comme des marqueurs de la lignée germinale dans le cadre de l'exploration de nouveaux organismes modèles.

L'analyse de la famille du transporteur à haute affinité de la choline CHT a révélé que ce gène provient d'une duplication propre aux eumétazoaires. L'expression d'un orthologue de CHT dans les neurones des tentilles et des tentacules chez *Pleurobrachia pileus* tend à confirmer l'existence de neurones cholinergiques chez les cténaires. Par ailleurs, les sites d'expression non neurale des deux paralogues *PpiCHT1* et *PpiCHT2*, confrontés aux données existant chez les hydrozoaires et les mammifères, montrent que la double implication de CHT (dans les contextes neuronal et non neuronal) est ancestrale chez les eumétazoaires. Les fonctions non neuronales ont été perdues secondairement dans certains groupes (p. ex. insectes).

L'analyse des composants de la densité post-synaptique a permis de reconstituer les étapes de la mise en place de cette structure emblématique de la synapse : une pré-densité existerait chez le dernier ancêtre commun des choanoflagellés et des métazoaires, avant même l'acquisition de la pluricellularité. D'autres composants de la densité post-synaptique sont apparus dans la branche commune des métazoaires. Ce complexe protéique a été co-opté pour sa fonction dans les synapses au cours de l'histoire évolutive des eumétazoaires.

## 4.2. Quelques réflexions suscitées par ces résultats

### *Limites du concept de type cellulaire*

L'approche typologique donne un canevas opérationnel pour étudier l'évolution de l'organisation des métazoaires. Ces dernières années, des progrès considérables ont été faits dans la caractérisation des profils d'expression de gènes spécifiques de différents types cellulaires. L'absence ou la présence de l'expression d'un gène, ou d'une combinatoire de gènes, dans un type cellulaire donné peut être formalisée comme un caractère, dont on peut tenter de reconstituer l'évolution sur l'arbre phylogénétique des organismes. Ce type d'approche a été théorisé par Arendt (2005, 2008), qui propose de se baser sur les signatures moléculaires (« *molecular fingerprint* ») des cellules pour établir les homologies de types cellulaires à grande échelle phylogénétique, le but affiché étant de reconstruire les répertoires des types cellulaires des ancêtres aux différents niveaux de l'arbre.

Cette approche, qui s'avère très fructueuse dans certains contextes (Thor & Thomas 2002, Arendt et al. 2004, Tessmar-Raible et al. 2007) présente toutefois un certain nombre de difficultés, particulièrement lorsque l'on se place à l'échelle des métazoaires et même des eumétazoaires. Un premier problème réside dans le caractère assez flou voire arbitraire de la délimitation des catégories de cellules. L'existence d'un continuum entre cellules nerveuses et cellules sensorielles (cf. § 3.1.2.) fournit une bonne illustration de ce problème. Un deuxième problème est de savoir s'il existe un lien stable à grande échelle évolutive entre une catégorie de cellules et une combinatoire de gènes données, condition nécessaire à l'utilisation des « *molecular fingerprints* » pour étayer l'homologie de catégories cellulaires. La combinaison *Piwi* / *Vasa* / *Bruno* / *PL10* semble utilisée dans différents contextes (lignée germinale, cellules souches), vraisemblablement en lien avec une exigence de protection du génome. Cela n'implique pas une homologie, c'est-à-dire un lien généalogique, entre lignée germinale et systèmes de cellules souches. Des systèmes de cellules souches ont d'ailleurs pu être acquis de façon indépendante dans différentes lignées animales, mobilisant ou non la machinerie Piwi. Ainsi, les néoblastes des Plathelminthes et les cellules interstitielles des hydrozoaires (synapomorphies respectives de ces deux groupes) ne sont certainement pas homologues. De même, la combinatoire des protéines impliquées dans la transmission cholinergique n'est absolument pas liée à un type cellulaire particulier (voir introduction de l'article 3). Enfin, nous avons suggéré dans l'article 2 que l'ancêtre du complexe protéique postsynaptique, dans le contexte unicellulaire où il a émergé, n'était probablement pas lié à la communication intercellulaire. Bien qu'il ait été ensuite intégré au sein de la synapse, chez les eumétazoaires, il ne me semble donc pas opportun d'utiliser cette

combinatoire particulière de gènes pour identifier d'éventuelles homologues de cellules neuro-sensorielles en dehors des eumétazoaires.

Les organismes présentent une structure modulaire à tous les niveaux, et notamment à l'échelle subcellulaire. Les ensembles protéiques que nous venons de citer sont des exemples de tels modules, qui peuvent être déployés dans tel ou tel type cellulaire d'un organisme donné (voir p. ex. l'expression de CHT dans certains neurones, dans certaines cellules épithéliales ciliées et dans les ovocytes chez *Pleurobrachia pileus*). La façon dont ces modules structuro-fonctionnels se combinent au sein des différentes cellules de l'organisme est probablement très dynamique sur le plan évolutif. L'origine de la synapse chimique représente un exemple particulièrement frappant de regroupement de différents modules (p. ex. liés à biosynthèse de la molécule signal, à l'exocytose, à l'adhésion cellulaire), dont certains opéraient antérieurement dans un contexte complètement indépendant de la transmission paracrine – c'est probablement le cas de l'échafaudage de protéines sub-membranaires qui a donné la densité post-synaptique. Ce phénomène pourrait être qualifié d'agrégation de fonctions, et représente potentiellement un mécanisme important de complexification de l'organisation cellulaire, alternatif au scénario de la ségrégation de fonction (voir Fig. 46A), et ne reposant pas sur la notion de type cellulaire.

### *L'innovation évolutive, un problème complexe*

L'origine du système nerveux représente un paradoxe exemplaire : ce dernier représente un attribut extrêmement original des animaux eumétazoaires, qui a rendu possible une extrême sophistication du comportement dans certaines lignées. Toutefois, lorsqu'on décompose les éléments qui constituent ce système nerveux (en descendant aux échelles cellulaire et moléculaire), il apparaît qu'une majorité d'entre eux ne constitue pas véritablement des innovations des eumétazoaires. Le concept d'innovation évolutive a donné lieu à d'innombrables discussions dans la littérature, et encore aujourd'hui sa définition et ses limites ne sont pas consensuelles (pour une revue voir p. ex. Moczek 2008). A partir des exemples envisagés au cours de ma thèse, il me semble qu'on peut distinguer au moins trois niveaux d'innovation évolutive. La nouveauté peut tout d'abord provenir de la modification, plus ou moins marquée, de l'ancien – par exemple, un gène qui se modifie insensiblement en accumulant des substitutions. Ainsi, nous avons présenté le transporteur CHT comme une innovation des eumétazoaires (Article 3). Ce transporteur est en fait issu d'une duplication chez un ancêtre commun des eumétazoaires, qui a dû donner deux copies au départ identiques. C'est la divergence ultérieure de la séquence au cours du temps, accompagnée d'une divergence fonctionnelle, qui fait que nous reconnaissons CHT comme un nouveau gène. Une autre forme de nouveauté consiste

en l'acquisition d'une fonctionnalité nouvelle par une structure ancienne. Ce phénomène a été largement popularisé sous le nom de co-option (ou co-optation) et son résultat est appelé exaptation (Gould 2002). Le recrutement d'une « pré-densité post-synaptique » pour réaliser une fonction dans le contexte synaptique chez les eumétazoaires est un exemple évident d'exaptation. Enfin, on est face à un troisième niveau d'innovation évolutive lorsque, de la conjugaison entre des modules anciens émerge une structure et/ou une fonction nouvelle à un niveau d'organisation supérieure. C'est le cas, comme je l'ai souligné plus haut, de la synapse chimique. On voit bien que la question de l'innovation évolutive dépend totalement du niveau d'organisation biologique auquel on choisit de se placer. Un objet biologique donné est une constellation d'innovations évolutives à différents niveaux organisationnels et phylogénétiques. C'est ainsi que se résout l'apparent paradoxe de l'origine du système nerveux : du nouveau authentique s'élabore en construisant sur de l'ancien. Ces considérations rejoignent l'idée de « bricolage de l'évolution » (Jacob 1977).

### 4.3. Perspectives

#### *Développer les études fonctionnelles sur les cellules souches*

Sur le plan expérimental, l'un des défis les plus pressants est de développer des manipulations « fonctionnelles ». Pour tenter d'agir sur l'expression de gènes chez l'adulte de *Pleurobrachia pileus*, une approche possible serait l'ARN interférence (par « soaking » ou par « feeding »), utilisée avec succès par exemple chez l'hydre et chez les planaires adultes (Miljkovic-Licina et al. 2007, Reddien et al. 2005, Nishimura et al. 2010). Au moyen de ce type de techniques, il serait possible d'analyser l'effet d'une inhibition des gènes *Piwi*, *Vasa*, etc. sur le maintien des populations de cellules souches. En utilisant la racine tentaculaire comme modèle pour l'étude des cellules souches, on pourrait aussi par exemple étudier les perturbations de la dynamique du système après inhibition de composants de la voie Wnt ou d'autres voies de signalisation. Suite à ce type de manipulation, on pourrait par exemple s'attendre à une perturbation du rythme de divisions (visualisable par des marquages à l'Edu), et/ou à des défauts de différenciation des différents types cellulaires du tentacule. Par ailleurs, une voie prometteuse pour l'avenir est celle des expériences de régénération (p. ex. de tentacules, de rangées de peignes...).

### *L'origine de la lignée germinale chez Pleurobrachia*

Il existe un débat dans la littérature concernant le mécanisme ancestral de spécification de la lignée germinale au cours du développement. Deux mécanismes sont connus : ou bien la lignée germinale se forme tardivement au cours du développement, par un mécanisme d'induction (« épigenèse »), ou bien la lignée germinale est mise en place très précocement. Dans ce second cas, on observe dès le stade œuf un plasme germinal, zone spécialisée du cytoplasme contenant des ARNm et protéines d'origine maternelle (dont *Vasa*, *Piwi*, etc. cf. début de la partie 2.2), et les blastomères qui héritent ce plasme germinal vont donner la lignée germinale (« préformation »). Le point de vue dominant actuellement est que l'épigenèse est le mode ancestral de spécification de la lignée germinale, aussi bien au niveau des métazoaires que des Bilateria (Extavour 2007). Toutefois, le travail réalisé dans notre équipe par Lucas Leclère a montré que les ARNm de *Vasa*, *Nanos*, *Piwi* et *PL10* forment un plasme germinal dans l'œuf de la méduse *Clytia hemisphaerica*. Ce plasme germinal persiste au cours du clivage et est hérité par les cellules interstitielles, ce qui laisse supposer que ces dernières sont spécifiées par un mécanisme similaire à la « préformation » (Leclère 2008). Afin de déterminer si le plasme germinal est ou non une caractéristique ancestrale des eumétazoaires, il est essentiel d'obtenir des données sur les cténaires. Je n'ai pas obtenu durant ma thèse de résultats d'expression des gènes *Vasa*, *Piwi*, *PL10* et *Bruno* dans les œufs et les stades précoce du développement, en grande partie par manque de temps et de matériel biologique.

### *Transcriptomique comparée*

Les études sur des gènes candidats comme celles présentées dans cette thèse sont fructueuses pour appréhender l'évolution d'une famille de gènes, de son lien éventuel à un ou plusieurs « type(s) cellulaire(s) », de ses fonctions. Aujourd'hui, les études de transcriptomique comparée offrent l'opportunité d'une approche complémentaire permettant l'identification systématique de gènes fortement exprimés dans des structures/tissus/cellules données. Par exemple, chez *Pleurobrachia*, il serait envisageable de microdisséquer les crêtes latérales et/ou médiane de la racine tentaculaire (enrichies en cellules souches) et de comparer leur transcriptome à celui de cellules en cours de différenciation ou différencier (colloblastes, muscles...). Une autre structure qui pourrait être analysée de cette façon est l'organe aboral, riche en cellules neurosensorielles. Ce type d'approche permettrait de caractériser le répertoire de gènes exprimés spécifiquement dans les cellules souches, ou encore dans les cellules neuro-sensorielles, de cténaire. À travers des comparaisons avec les autres lignées (cnidaires, Bilateria et les groupes externes, spongaires, placozaires...), il serait alors

possible de tester l'éventuelle existence, éventuellement, d'une « boîte à outils moléculaires » ancestrale des cellules souches ; des cellules neuro-sensorielles...

### *Diversifier les modèles de cténaires*

Nous avons vu dans l'introduction de cette thèse (§ 1.2.1.) que les cténaires ont une morphologie assez variée. Les Cydippida sont réputés posséder des caractères morphologiques plésiomorphes (en raison de leur ressemblance avec la larve cydippide présente dans les autres ordres, et de leur paraphylie, Podar et al. 2001), mais ce n'est pas une raison pour penser que *Pleurobrachia* est représentatif de l'ancêtre commun des cténaires. Diversifier les modèles au sein des cténaires au-delà des deux espèces étudiées actuellement (*Pleurobrachia pileus* et *Mnemiopsis leidyi*) serait judicieux afin d'appréhender la diversité des caractères au sein du groupe et de reconstituer les états ancestraux, ce qui est important pour les comparaisons avec les autres lignées. Mais au-delà de leur intérêt dans l'étude des nœuds profonds de l'arbre des métazoaires (origine du système nerveux, du mésoderme, des axes de polarité, etc.), les cténaires sont un groupe fascinant en eux-mêmes. Ils le sont par l'extraordinaire originalité de leur organisation, de même que par sa sophistication, ainsi que par certains aspects de la diversité morpho-anatomique au sein de l'embranchement. Par exemple, certains platycténides (groupe devenu benthique), ont perdu les rangées de peignes. Les lobés ont non seulement acquis un nouveau mode de communication entre les peignes (voir § 1.1.2., Fig. X), mais aussi un mode dérivé de nutrition s'accompagnant de la réduction des tentacules. La perspective d'un renouveau de l'anatomie comparée des cténaires nécessite de réaliser des progrès dans les techniques de fixation de ces organismes. En effet, avec les protocoles traditionnels (alcool, formol...) les tissus des adultes de la plupart des espèces se désintègrent complètement, rendant inenvisageables des expériences du type immunohistochimie ou hybridations *in situ* sur ces adultes. Néanmoins, des essais prometteurs nous laissent espérer que ce verrou sera rapidement levé. Enfin, la reconstruction de l'évolution des caractères morpho-anatomiques nécessite un cadre phylogénétique. Ce dernier restant actuellement très flou, il sera nécessaire de mettre à profit les capacités nouvelles de séquençage, combinées à un gros effort d'échantillonnage taxonomique, pour tenter de résoudre les relations de parenté entre les différents groupes de cténaires.

## Références citées dans les chapitres en français

- Abdelhaleem M (2005). RNA helicases: regulators of differentiation. *Clin Biochem.* 38:499
- Adamska M, Degnan SM, Green KM, Adamski M, Craigie A, Larroux C, Degnan BM (2007). Wnt and TGF-beta expression in the sponge *Amphimedon queenslandica* and the origin of metazoan embryonic patterning. *PLoS One* 2(10):e1031
- Aerne BL, Stidwill RP, Tardent P (1991). Nematocyst discharge in hydra does not require the presence of nerve cells. *J Exp Zool* 258:137
- Afzelius BA (1961). The fine structure of the cilia from ctenophore swimming-plates. *J Biophys Biochem Cytol.* 9:383
- Akashi K, He X, Chen J, Iwasaki H, Niu C, Steenhard B, Zhang J, Haug J, Li L (2003). Transcriptional accessibility for genes of multiple tissues and hematopoietic lineages is hierarchically controlled during early hematopoiesis. *Blood* 101: 383
- Alié A, Manuel M (2010). The backbone of the post-synaptic density originated in a unicellular ancestor of choanoflagellates and metazoans. *BMC Evol Biol.* 10:34.
- Alkatout I, Kalthoff H (2007). Tumor Stem Cells: How to Define Them and How to Find Them? In *Stem Cells:From Hydra to Man.* Chap. 10. Thomas Bosh (Ed). Springer Science. p.165
- Almeida MS, Bray SJ (2005). Regulation of post-embryonic neuroblasts by *Drosophila* Grainyhead. *Mech Dev.* 122:1282
- Anderson PA, Greenberg RM (2001). Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 129:17
- Arai, F. and Suda, T., Quiescent stem cells in the niche (July 11, 2008), StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, doi/10.3824/stembook.1.6.1, <http://www.stembook.org>.
- Arendt D (2003). Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int J Dev Biol.* 47:563
- Arendt D (2005). Genes and homology in nervous system evolution: comparing gene functions, expression patterns, and cell type molecular fingerprints. *Theory Biosci.* 124:185

Arendt D (2008). The evolution of cell types in animals: emerging principles from molecular studies. *Nat Rev Genet.* 9:868

Arendt D, Tessmar-Raible K, Snyman H, Dorresteijn AW, Wittbrodt J (2004). Ciliary photoreceptors with a vertebrate-type opsin in an invertebrate brain. *Science.* 306:869

Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17:126

Baguñà J, Riutort M (2004). The dawn of bilaterian animals: the case of acoelomorph flatworms. *Bioessays.* 26:104

Beckmann J, Scheitza S, Wernet P, Fischer JC, Giebel B (2007). Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. *Blood.* 109:5494

Benwitz G (1978). Elektronenmikroskopische Untersuchung der Colloblasten-Entwicklung bei der Ctenophore *Pleurobrachia pileus* (Tentaculifera, Cydippea). *Zoomorphologie* 89:257

Betschinger J, Mechtler K, Knoblich JA (2006). Asymmetric Segregation of the Tumor Suppressor Brat Regulates Self-Renewal in *Drosophila* Neural Stem Cells. *Cell* 124:1241

Bode HR (1996). The interstitial cell lineage of hydra: a stem cell system that arose early in evolution. *J Cell Sci.* 109 ( Pt 6):1155

Borchiellini C, Manuel M, Alivin E, Boury-Esnault N, Vacelet J, Le Parco Y (2001). Sponge paraphyly and the origin of Metazoa. *J Evol Biol.* 14:171

Bosch TCG, David CN (1987). Stem cells of *Hydra magnipapillata* can differentiate into somatic cells and germ line cells. *Dev. Biol.* 121:182

Bosch TC (2010). *Hydra* and the evolution of stem cells. *Bioessays.* 31:478

Bosch TCG, Anton-Erxleben F, Hemmrich G, Khalturin K (2010). The Hydra polyp: nothing but an active stem cell community. *Dev Growth Differ.* 52:15

Bourlat SJ, Hejnol A (2009). Acoels. *Curr Biol.* 19:R279-280.

Brinkmann M, Oliver D, Thurm U (1996). Mechanoelectric transduction in nematocytes of a hydropolyp (Corynidae). *J. Comp. Phys. A.* 178:125

Brown FD, Swalla BJ (2007). Vasa expression in a colonial ascidian, *Botrylloides violaceus*. *Evol Dev.* 9:165.

Brusca RC, Brusca GJ (2003). *Invertebrates*, 2nd edition. Sinauer Associates, Inc. (Publishers). Sunderland, Massachusetts.

Bullock TH, Horridge GA (1965). *Structure and Function in the Nervous System of Invertebrates*. Edition W.H. Freeman & Company, San Francisco and London.

Cai Y, Chia W, Yang X (2001). A family of snail-related zinc finger proteins regulates two distinct and parallel mechanisms that mediate *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *EMBO J.* 20:1704

Cai X (2008). Unicellular Ca<sup>2+</sup> signaling 'toolkit' at the origin of metazoa. *Mol Biol Evol.* 25:1357

Cairns J (2002). Somatic stem cells and the kinetics of mutagenesis and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10567

Capkova Frydrychova R, Biessmann H, Mason JM (2008). Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cytogenet Genome Res.* 122:356

Carré C, Carré D (1980). Les cnidocytes du cténophore *Euchlora rubra* (Kölliker 1853). *Cah Biol Mar.* 21:221

Carré D (1984). Existence d'un complexe acrosomal chez les spermatozoïdes du cnidaire *Muggiea kochi* (Siphonophore, Calycophore) : différenciation et réaction acrosomale. *Intl J Invertebr Rerod Dev.* 7:95

Carré D, Carré C (1993). Five types of colloblasts in a cydippid ctenophore, *Minictena luteola* Carré and Carré: an ultrastructural study and cytological interpretation. *Phil Trans R Soc Lond. B.* 341:437

Cellot S, Sauvageau G (2007). Zfx: at the Crossroads of Survival and Self-renewal. *Cell* 129:239

Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell.* 113:643

Chambers SM, Shaw CA, Gatza C, Fisk CJ, Donehower LA, Goodell MA (2007). Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol.* 5(8):e201.

Chapman JA, Kirkness EF, Simakov O, Hampson SE, Mitros T, Weinmaier T, Rattei T, Balasubramanian PG, Borman J, Busam D, Disbennett K, Pfannkoch C, Sumin N, Sutton GG, Viswanathan LD, Walenz B, Goodstein DM, Hellsten U, Kawashima T, Prochnik SE, Putnam NH, Shu S, Blumberg B, Dana CE, Gee L, Kibler DF, Law L, Lindgens D, Martinez DE, Peng J, Wigge PA, Bertulat B, Guder C,

- Nakamura Y, Ozbek S, Watanabe H, Khalturin K, Hemmrich G, Franke A, Augustin R, Fraune S, Hayakawa E, Hayakawa S, Hirose M, Hwang JS, Ikeo K, Nishimiya-Fujisawa C, Ogura A, Takahashi T, Steinmetz PR, Zhang X, Aufschnaiter R, Eder MK, Gorny AK, Salvenmoser W, Heimberg AM, Wheeler BM, Peterson KJ, Böttger A, Tischler P, Wolf A, Gojobori T, Remington KA, Strausberg RL, Venter JC, Technau U, Hobmayer B, Bosch TC, Holstein TW, Fujisawa T, Bode HR, David CN, Rokhsar DS, Steele RE. (2010). The dynamic genome of *Hydra*. *Nature*. 464:592
- Chen D, McKearin D (2003). Dpp signaling silences *bam* transcription directly to establish asymmetric divisions of germline stem cells. *Curr Biol*. 13:1786
- Chiori R, Jager M, Denker E, Wincker P, Da Silva C, Le Guyader H, Manuel M, Quéinnec E (2009). Are Hox genes ancestrally involved in axial patterning? Evidence from the hydrozoan *Clytia hemisphaerica* (Cnidaria). *PLoS One*. 4(1):e4231
- Choksi SP, Southall TD, Bossing T, Edoff K, deWit E, Fischer BE, van Steensel B, Micklem G, Brand AH (2006). Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells. *Develop Cell* 11:775
- Christen R, Ratto A, Baroin A, Perasso R, Grell KG, Adoutte A (1991). An analysis of the origin of metazoans, using comparisons of partial sequences of the 28S RNA, reveals an early emergence of triploblasts. *EMBO J*. 10:499
- Chun C. (1880). Die Ctenophoren des Golfes von Neapel und der angrenzenden Meeres-Abschnitte: eine Monographie. Leipzig: Verlag von W. Engelmann.
- Chun C. (1892). Die Dissogonie, eine neue Form der geschlechtlichen Zeugung. *Festsh. Zum siebenzigsten Geburtstage Rudolf Leuckarts* 77-108
- Collins AG (1998). Evaluating multiple alternative hypotheses for the origin of Bilateria: an analysis of 18S rRNA molecular evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:15458
- Cox DN, Chao A, Baker J, Chang L, Qiao D, Lin H (1998). A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev*. 12:3715.
- Cox DN, Chao A, Lin H (2000). piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development*. 127:503
- Cuvier, G (1817). Le règne animal distribué d'après son organisation, pour servir de base à l'histoire naturelle des animaux et d'introduction à l'anatomie comparée, volume 2. Deterville, Paris.

- Dambly-Chaudière C, Vervoort M (1998). The bHLH genes in neural development. *Int J Dev Biol.* 42:269
- David, CN, Murphy S (1977). Characterization of interstitial stem cells in hydra by cloning. *Dev Biol.* 58:372
- Decotto E, Spradling AC (2005). The *Drosophila* ovarian and testis stem cell niches : similar somatic stem cells and signals. *Dev Cell.* 9:501
- Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D, Philippe H (2006). Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature.* 439:965
- De-Miguel FF, Trueta C (2005). Synaptic and extrasynaptic secretion of serotonin. *Cell Mol Neurobiol.* 25:297
- Deng W, Lin H. (1997). Spectrosomes and fusomes anchor mitotic spindles during asymmetric germ cell divisions and facilitate the formation of a polarized microtubule array for oocyte specification in *Drosophila*. *Dev Biol.* 189:79
- Denker E, Manuel M, Leclère L, Le Guyader H, Rabet N (2008a). Ordered progression of nematogenesis from stem cells through differentiation stages in the tentacle bulb of *Clytia hemisphaerica* (Hydrozoa, Cnidaria). *Dev Biol.* 315:99
- Denker E, Chatonnet A, Rabet N (2008b). Acetylcholinesterase activity in *Clytia hemisphaerica* (Cnidaria). *Chem Biol Interact.* 175:125
- Derelle R, Manuel M (2007). Ancient connexion between NKL genes and the mesoderm ? Insights from *Tlx* expression in a ctenophore. *Dev Genes Evol.* 217:253
- De Vos L, Rützler K, Boury-Esnault N, Donadey C, Vacelet J (1991). *Atlas of sponge morphology. Atlas de morphologie des éponges*. McKnight R (Ed.). Smithsonian Institution
- Driesch H & Morgan (1895). Zur Analysis der ersten Entwickelungsstadien des Ctenophoreneies. *Arch. Entwicklungsmech. Organ* 2:204.
- Duncan G, Collison DJ (2003). Role of the non-neuronal cholinergic system in the eye: a review. *Life Sci.* 72:2013
- Dunn CW, Hejnol A, Matus DQ, Pang K, Browne WE, Smith SA, Seaver E, Rouse GW, Obst M, Edgecombe GD, Sørensen MV, Haddock SH, Schmidt-Rhaesa A, Okusu A, Kristensen RM, Wheeler WC, Martindale MQ, Giribet G (2008). Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature.* 452:745

Ebnet E, Fischer M, Deininger W, Hegemann P (1999). Volvoxrhodopsin, a light-regulated sensory photoreceptor of the spheroidal green alga *Volvox carteri*. *Plant Cell*. 11:1473

Egger B, Steinke D, Tarui H, De Mulder K, Arendt D, Borgonie G, Funayama N, Gschwentner R, Hartenstein V, Hobmayer B, Hooge M, Hrouda M, Ishida S, Kobayashi C, Kuales G, Nishimura O, Pfister D, Rieger R, Salvenmoser W, Smith J, Technau U, Tyler S, Agata K, Salzburger W, Ladurner P (2009). To be or not to be a flatworm: the acoel controversy. *PLoS One*. 4(5):e5502.

Egger B, Gold KS, Brand AH (2010). Notch regulates the switch from symmetric to asymmetric neural stem cell division in the *Drosophila* optic lobe. *Development*. 137:2981

Elliott GR, Leys SP (2010). Evidence for glutamate, GABA and NO in coordinating behaviour in the sponge, *Ephydatia muelleri* (Demospongiae, Spongillidae). *J Exp Biol*. 213:2310

Ellis CH Jr, Fausto-Sterling A (1997). Platyhelminthes; the flatworms. In *Embryology: constructing the organism*. Gilbert SF, Raunio AM (Ed). Sinauer Associates, Sunderland (USA). p 115

Ereskovsky AV (2010). *The Comparative Embryology of Sponges*. Springer.

Extavour CG (2007). Evolution of the bilaterian germ line: lineage origin and modulation of specification mechanisms. *Int Comp Biol*. 47:770

Extavour CG, Akam M (2003). Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development*. 130:5869

Fell PE (1997). Poriferans, the Sponges. In *Embryology :constructing the organism*. Gilbert SF, Raunio AM (Ed). Sinauer Associates, Sunderland (USA). p 39

Felsenstein J (1978). Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Biology*. 27:401

Ficara F, Murphy MJ, Lin M, Cleary ML (2008). Pbx1 regulates self-renewal of long-term hematopoietic stem cells by maintaining their quiescence. *Cell Stem Cell* 2:484

Fischel A (1903). Entwicklung und Organdifferenzierung. *Arch Entwicklungsmech. Organ.* 15:679

Finnerty JR, Pang K, Burton P, Paulson D, Martindale MQ (2004). Origins of bilateral symmetry: Hox and dpp expression in a sea anemone. *Science*. 28:1335

Fleming HE, Janzen V, Lo Celso C, Guo J, Leahy KM, Kronenberg HM, Scadden DT (2008). Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell.* 2:274

Flores I, Canela A, Vera E, Tejera A, Cotsarelis G, Blasco MA (2008). The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev.* 22:654

Flores I, Blasco MA (2010). The role of telomeres and telomerase in stem cell aging. *FEBS Lett.* 584:3826

Forsberg EC, Passegué E, Prohaska SS, Wagers AJ, Koeva M, Stuart JM, Weissman IL (2010). Molecular signatures of quiescent, mobilized and leukemia-initiating hematopoietic stem cells. *PLoS One.* 5(1):e8785.

Franc J-M (1985). La mésoglée des cténaires: approches ultrastructurale, biochimique et métabolique. Thèse de l'Université Claude Bernard, Lyon.

Freeman G (1964). The role of blood cells in the process of asexual reproduction in the tunicate *Perophora viridis*. *J Exp Zool.* 156:157

Freeman G (1976). The role of cleavage in the localization of developmental potential in the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*. *Dev. Biol.* 49:143

Freeman G (1977). The establishment of the oral-aboral axis in the ctenophore embryo. *J. Exp. Embryol. Morphol.* 42:237

Funayama N (2010). The stem cell system in demosponges: insights into the origin of somatic stem cells. *Dev Growth Differ.* 52:1

Funayama N, Nakatsukasa M, Mohri K, Masuda Y, Agata K (2010). Piwi expression in archeocytes and choanocytes in demosponges: insights into the stem cell system in demosponges. *Evol Dev.* 12:275

Fromm J, Hajirezaei M, Wilke I (1995). The Biochemical Response of Electrical Signaling in the Reproductive System of Hibiscus Plants. *Plant Physiol.* 109:375

Fromm J, Lautner S (2007). Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant Cell Environ.* 30:249

Galliot B, Miljkovic-Licina M, de Rosa R, Chera S (2006). Hydra, a niche for cell and developmental plasticity. *Semin Cell Dev Biol.* 17:492

Galliot B, Quiquand M, Ghila L, de Rosa R, Miljkovic-Licina M, Chera S (2009). Origins of neurogenesis, a cnidarian view. *Dev Biol.* 332:2

Galtier N, Gouy M, Gautier C. (1996). SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci.* 12:543

Gazave E, Lapébie P, Renard E, Bézac C, Boury-Esnault N, Vacelet J, Pérez T, Manuel M, Borchiellini C. (2008). NK homeobox genes with choanocyte-specific expression in homoscleromorph sponges. *Dev Genes Evol.* 218:479

Gazave E, Lapébie P, Richards GS, Brunet F, Ereskovsky AV, Degnan BM, Borchiellini C, Vervoort M, Renard E. (2009). Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes. *BMC Evol Biol.* 9:249

Gilbert SF, Burian RM (2003). Development, Evolution, and Evolutionary Developmental Biology. In *Keywords and Concepts in Evolutionary Developmental Biology*. Hall BK, Olson WM (Ed.). Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts & London, England.

Gomes NM, Shay JW, Wright WE (2010). Telomere biology in Metazoa. *FEBS Lett.* 584:3741

Gould SJ (2002). The Structure of the Evolutionary Theory. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge (Mass.), London (England). 1433p.

Greenspan RJ (2007). *An introduction to nervous system*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Grimmelikhuijzen CJP, Graff D, Koizumi O, Westfall JA, McFarlane ID (1991). Neuropeptides in coelenterates: a review. *Hydrobiologia.* 216/217:555

Grimmelikhuijzen CJP, Westfall JA (1995). The nervous system of Cnidarians. In *The Nervous system of Invertebrates: An Evolutionary and Comparative Approach*. Breidbach O, Kutsch W (Ed.). Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin.

Guindon S, Gascuel O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 52:696

Guo T, Peters AH, Newmark PA (2006). A Bruno-like gene is required for stem cell maintenance in planarians. *Dev Cell.* 11:159

Gustafson EA, Wessel GM (2010). Vasa genes: emerging roles in the germ line and in multipotent cells. *Bioessays.* 32:626

Haberberger RV, Pfeil U, Lips KS, Kummer W (2002). Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the neuronal and non-neuronal cholinergic system of human and rat skin. *J Invest Dermatol.* 119:943

Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid Symp Ser* 41:95

Harbison GR, Madin LP (1982). Ctenophora. In *Synopsis and classification of living organisms*. Parker SP (Ed.). McGraw-Hill, New York. Vol. 1. p.707

Harbison GR (1985). On the classification and evolution of the Ctenophora. In *The origins and relationships of lower invertebrates*. S.C. Morris, J.D. George, R. Gibson, H.M. Platt (Ed). Clarendon Press, Oxford

Harrison FW, De Vos L (1991). Porifera. In *Microscopic Anatomy of Invertebrates, Vol. 2 :Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora*. Wiley-Liss, New-York. p. 29

Hejnol A, Obst M, Stamatakis A, Ott M, Rouse GW, Edgecombe GD, Martinez P, Baguñà J, Bailly X, Jondelius U, Wiens M, Müller WE, Seaver E, Wheeler WC, Martindale MQ, Giribet G, Dunn CW (2009). Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proc Biol Sci.* 276:4261

Hemmrich G, Bosch TC (2008). Compagen, a comparative genomics platform for early branching metazoan animals, reveals early origins of genes regulating stem-cell differentiation. *Bioessays*. 30:1010

Henry JQ, Martindale MQ (2001). Multiple inductive signals are involved in the development of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*. *Dev Biol.* 238:40

Hernandez-Nicaise M-L (1974). Système nerveux et intégration chez les cténaires. Etude ultrastructurale et comportementale. Thèse de l'Université Claude Bernard, Lyon.

Hernandez-Nicaise M-L (1991). Ctenophora. In *Microscopic Anatomy of Invertebrates, Vol. 2 :Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora*. Wiley-Liss, New-York. p. 439

Hertwig R (1880). *Ueber den Bau der Ctenophoren*, G. Fischer

Hock H, Meade E, Medeiros S, Schindler JW, Valk PJ, Fujiwara Y, Orkin SH (2004). Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev.* 18:2336

Horiuchi Y, Kimura R, Kato N, Fujii T, Seki M, Endo T, Kato T, Kawashima K (2003). Evolutional study on acetylcholine expression. *Life Sci.* 72:1745

Hyman LH (1940). *The Invertebrates Vol. 1: Protozoa through Ctenophora*. McGraw-Hill Book Company, Inc. New York and London.

Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR (2002). A stem cell molecular signature. *Science* 298: 601

Jacob F (1977). Evolution and Tinkering. *Science*. 196:1161.

Jacobs DK, Nakanishi N, Yuan D, Camara A, Nichols SA, Hartenstein V (2007). Evolution of sensory structures in basal metazoa. *Integr Comp Biol* 47:712

Jager M, Quéinnec E, Houlston E, Manuel M (2006). Expansion of the SOX gene family predated the emergence of the Bilateria. *Mol Phylogenet Evol*. 39:468

Jager M, Quéinnec E, Chiori R, Le Guyader H, Manuel M (2008). Insights into the early evolution of SOX genes from expression analyses in a ctenophore. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 310:650

Jager M, Chiori R, Alié A, Dayraud C, Quéinnec E, Manuel M. New insights on ctenophore neural anatomy: immunofluorescence study in Pleurobrachia pileus (Müller, 1776). *J Exp Zoo B Mol Dev Evol* In press

Kai T, Spradling A (2004). Differentiating germ cells can revert into functional stem cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Nature*. 428:564

Karpowicz P, Pellikka M, Chea E, Godt D, Tepass U, van der Kooy D (2009). The germline stem cells of *Drosophila melanogaster* partition DNA non-randomly. *Eur J Cell Biol*. 88:397

Kass-Simon G, Pierobon P (2007). Cnidarian chemical neurotransmission, an updated overview. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 146:9

Katsumoto K, Shiraki N, Miki R, Kume S (2010). Embryonic and adult stem cell systems in mammals : ontology and regulation. *Dev Growth Differ*. 52:115

Kawamura K, Sunanaga T. (2010) Hemoblasts in colonial tunicates:are they stem cells or tissue-restricted progenitor cells? *Dev Growth Differ*. 52:69

Khalturin K, Anton-Erxleben F, Milde S, Plötz C, Wittlieb J, Hemmrich G, Bosch TC (2007). Transgenic stem cells in *Hydra* reveal an early evolutionary origin for key elements controlling self- renewal and differentiation. *Dev Biol*. 309:32

Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst C, Morrison SJ (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121:1109

Kim JY, Lee YC, Kim C (2010). Direct inhibition of Pumilo activity by Bam and Bgcn in *Drosophila* germ line stem cell differentiation. *J Biol Chem.* 12:4741

Kloda A, Martignac B (2002). Common evolutionary origins of mechanosensitive ion channels in Archaea, Bacteria and cell-walled Eukarya. *Archae 1:35*

Kobayashi M, Takahashi M, Wada H, Satoh N (1993). Molecular phylogeny inferred from sequences of small subunit ribosomal DNA, supports the monophyly of the metazoa. *Zoolog Sci.* 10:827

Komai T (1963). A note on the phylogeny of Ctenophora. Dans *The lower metazoan:comparative biology and phylogeny* E.C. Dougherty (Ed.) p. 181. University of California Press, Berkeley, Ca.

Kummer K, Lips KS, Pfeil U (2008).The epithelial cholinergic system of the airways *Histochem Cell Biol* 130:219

Lacombe J, Herblot S, Rojas-Sutterlin S, Haman A, Barakat S, Iscove NN, Sauvageau G, Hoang T (2010). Scl regulates the quiescence and the long-term competence of hematopoietic stem cells. *Blood.* 115:792

Ladurner P, Rieger R, Baguñà J (2000). Spatial distribution and differentiation potential of stem cells in hatchlings and adults in the marine platyhelminth *Macrostomum sp.*: a bromodeoxyuridine analysis. *Dev Biol.* 226:231

Ladurner P, Egger B, De Mulder K, Pfister D, Kuales G, Salvenmoser W, Schärer L (2007). The Stem Cell System of the Basal Flatworm *Macrostomum lignano*. In *Stem Cells:From Hydra to Man*. Thomas Bosch (Ed). Springer Science p.75-94

Laird DJ, De Tomaso AW, Weissman IL (2005). Stem cells are units of natural selection in a colonial ascidian. *Cell.* 123:1351

Lange C, Calegari F (2010). Cdks and cyclins link G(1) length and differentiation of embryonic, neural and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle.* 23:9

Larroux C, Luke GN, Koopman P, Rokhsar DS, Shimeld SM, Degnan BM (2008). Genesis and expansion of metazoan transcription factor gene classes. *Mol Biol Evol.* 25:98

Leclère L (2008). Evolution de la reproduction sexuée des hydrozoaires : aspects historiques, analyse phylogénétique et développementale. Thèse de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris 6).

Lee CY, Wilkinson BD, Siegrist SE, Wharton RP, Doe CQ (2006)a. Brat is a Miranda cargo protein that promotes neuronal differentiation and inhibits neuroblast selfrenewal. *Develop Cell* 10:441

Lee CY, Andersen RO, Cabernard C, Manning L, Tran KD, Lanskey MJ, Bashirullah A, Doe CQ (2006)b.  
*Drosophila* Aurora-A kinase inhibits neuroblast self-renewal by regulating aPKC/Numb cortical polarity and spindle orientation. *Genes Develop* 20:3464

Lentz TL, Barnett RJ (1961). Enzyme histochemistry of *Hydra*. *J. Exp. Zool.* 147:125

Leuckart R (1848). Ueber die Morphologie und die Verwandtschaftsverhältnisse der Wirbellosen thiere. Ein Beitrag zur Charakteristik und Classification der thierischen Formen. Von Dr. Rudolf Leuckart., Braunschweig, F. Vieweg und Sohn.

Leys SP, Degnan BM (2001). Cytological basis of photoresponsive behavior in a sponge larva. *Biol Bull.* 201:323

Li L, Vaessin H (2000). Pan-neural Prospero terminates cell proliferation during *Drosophila* neurogenesis. *Genes Develop* 14:147

Lips KS, Volk C, Schmitt BM, Pfeil U, Arndt P, Miska D, Ermert L, Kummer W, Koepsell H (2005). Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 33:79

Mackie GO (1973). Report on giant nerve fibers in *Nanomia*. *Publ Seto Marine Lab.* 20:745

Manuel M, Borchiellini C, Alivon E, Le Parco Y, Vacelet J, Boury-Esnault N (2003). Phylogeny and evolution of calcareous sponges: monophyly of Calcinea and Calcaronea, high level of morphological homoplasy, and the primitive nature of axial symmetry. *Syst Biol.* 52:311

Marlow HQ, Srivastava M, Matus DQ, Rokhsar D, Martindale MQ (2009). Anatomy and development of the nervous system of *Nematostella vectensis*, an anthozoan cnidarian. *Dev Neurobiol.* 69:235

Martindale MQ, Henry JQ (1997a). Ctenophorans, the comb jellies. In *Embryology: constructing the organism*. Gilbert SF, Raunio AM (Ed). Sinauer Associates, Sunderland (USA). p. 87

Martindale MQ, Henry JQ (1997b). Reassessing embryogenesis in the Ctenophora: the inductive role of e1 micromeres in organizing ctene row formation in the “mosaic” embryo, *Mnemiopsis leidyi*. *Development* 124:1999

Martindale MQ, Henry JQ (1999). Intracellular fate mapping in a basal metazoan, the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*, reveals the origins of mesoderm and the existence of indeterminate cell lineages. *Dev Biol.* 214:243

Martindale MQ, Pang K, Finnerty JR (2004). Investigating the origins of triploblasty: 'mesodermal' gene expression in a diploblastic animal, the sea anemone *Nematostella vectensis* (phylum, Cnidaria; class, Anthozoa). *Development*. 131:2463

Martindale MQ (2005). The evolution of metazoan axial properties. *Nat Rev Genet*. 6:917

Masland RH (2004). Neuronal cell types. *Curr Biol*. 14:R497-500

Matthies DS, Fleming PA, Wilkes DM, Blakely RD (2006). The *Caenorhabditis elegans* choline transporter CHO-1 sustains acetylcholine synthesis and motor function in an activity-dependent manner. *J Neurosci*. 26:6200

Matus DQ, Pang K, Marlow H, Dunn CW, Thomsen GH, Martindale MQ (2006). Molecular evidence for deep evolutionary roots of bilaterality in animal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:11195

Mayerhofer A, Kunz L (2005). A non-neuronal cholinergic system of the ovarian follicle. *Ann Anat*. 187:521

McLean H, Verellen L, Caveney S, Donly C (2005). Molecular cloning and functional characterization of a neuronal choline transporter from *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem Mol Biol*. 35:61

Medina M, Collins AG, Silberman JD, Sogin ML (2001). Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *Proc Nat Acad Sci USA*. 98:9707

Metschnikoff (1885). Vergleichend-embryologische Studien. 4. Über die Gastrulation und Mesodermbildung der Ctenophoren. *Z wiss Zool* 42: 648

Michalopoulos GK (2009). Liver regeneration : Alternative epithelial pathways. *Int J Biochem Cell Biol*.

Michel V, Yuan Z, Ramsbir S, Bakovic M (2006). Choline transport for phospholipid synthesis. *Exp Biol Med* (Maywood). 231:490

Miljkovic-Licina M, Gauchat D, Galliot B (2004). Neuronal evolution: analysis of regulatory genes in a first-evolved nervous system, the hydra nervous system. *Biosystems*. 76:75

Miljkovic-Licina M, Chera S, Ghila L, Galliot B (2007). Head regeneration in wild-type hydra requires de novo neurogenesis. *Development*. 134:1191

Mills CE, Miller RL (1984). Ingestion of a medusa (*Aeginia citrea*) by the nematocyst-containing ctenophore *Haeckelia rubra* (formerly *Euchlora rubra*): phylogenetic implications. *Mar Biol*. 78:215

- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 113:631
- Mochizuki K, Nishimiya-Fujisawa C, Fujisawa T (2001). Universal occurrence of the vasa-related genes among metazoans and their germline expression in *Hydra*. *Dev Genes Evol*. 211:299
- Moczek AP (2008). On the origins of novelty in development and evolution. *Bioessays*. 30:432
- Momose T, Derelle R, Houliston E (2008). A maternally localised Wnt ligand required for axial patterning in the cnidarian *Clytia hemisphaerica*. *Development*. 135:2105
- Morrison SJ, Kimble J (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441:1068
- Müller (1776)
- Müller WEG, Müller IM (2003). The hypothetical ancestral animal. the Urmetazoa: telomerase activity in sponges (Porifera). *J Serb Chem Soc*. 68:257
- Naitoh Y, Eckert R (1969). Ionic mechanisms controlling behavioral responses of paramecium to mechanical stimulation. *Science*. 164:963
- Narbonne-Reveau K, Lilly M (2009). The Cyclin-dependent kinase inhibitor Dacapo promotes genomic stability during premeiotic S phase. *Mol Biol Cell*. 20:1960
- Nelson SB, Hempel C, Sugino K (2006). Probing the transcriptome of neuronal cell types. *Curr Op Neurobiol*. 16:571
- Newmark PA, Sánchez Alvarado A. (2000). Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Dev Biol*. 220:142
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 95:379
- Nichols SA, Dirks W, Pearse JS, King N (2006). Early evolution of animal cell signaling and adhesion genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:12451
- Nickel M (2010). Evolutionary emergence of synaptic nervous system: what can we learn from the non-synaptic, nerveless Porifera? *Invert Biol*. 129:1

Niehrs C. (2010). On growth and form: a Cartesian coordinate system of Wnt and BMP signaling specifies bilaterian body axes. *Development*. 137:845

Nielsen C (1987). *Haeckelia* (= *Euchlora*) and *Hydroctena* and the phylogenetic interrelationships of Cnidaria and Ctenophora. Sonderdruck aus Z. f. zool. Systematik u. Evolutionsforschung Band, Heft 1, S. 9-12

Nielsen C (1995). *Animal evolution. Interrelationships of the Living Phyla*. Oxford University Press, Oxford.

Nielsen C (2001). *Animal evolution. Interrelationships of the Living Phyla*. Second Edition. Oxford University Press, Oxford.

Nishimura K, Kitamura Y, Taniguchi T, Agata K. (2010). Analysis of motor function modulated by cholinergic neurons in planarian *Dugesia japonica*. *Neuroscience*. 168:18

Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell*. 123:917

Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K (2009). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*. 460:118

Ohmori H, Sasaki S. (1977). Development of neuromuscular transmission in a larval tunicate. *J Physiol*. 269:221

Okuda T, Haga T, Kanai Y, Endou H, Ishihara T, Katsura I (2000). Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat Neurosci* 3:120

Ortolani G (1963). Origine dell'organo apicale e dei derivati mesodermici nello sviluppo embrionale di Ctenofori. *Acta Embryol Morpho*. 10:13

Pang K, Martindale M (2008). Developmental expression of homeobox genes in the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*. *Dev Genes Evol* 218:307

Pang K, Ryan JF, Comparative Sequencing Program N, Mullikin JC, Baxevanis AD, Martindale MQ (2010). Genomic insights into Wnt signaling in an early diverging metazoan, the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*. *Evodevo*. 1(1):10

Parker GH (1905). Swimming plates in Ctenophores with references to theories of ciliary metachronism. *J Exp. Zool*. 2:407

Pavans de Ceccaty M (1959). Les structures cellulaires de type nerveux chez *Hippospongia communis* LMK  
*Ann Sci Nat Zool Biol Anim.* 12 :105

Pavans de Ceccaty M (1960). Les structures cellulaires de type nerveux et de type musculaire de l'aponge siliceuse *Tethya lyncurium* Lmck. *C R Acad Sci Paris* 251:1818

Pearse V, Pearse J, Buchsbaum M, Buchsbaum R (1987). Living Invertebrates. Blackwell and Boxwood (Ed). Boston, Massachusetts and Pacific Grove, California.

Peterson KJ, Eernisse DJ. (2001) Animal phylogeny and the ancestry of bilaterians: inferences from morphology and 18S rDNA gene sequences. *Evol Dev.* 3:170

Petersen CP, Reddien PW (2009). Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell.* 139:1056

Pfeil U, Lips KS, Eberling L, Grau V, Haberberger RV, Kummer W (2003). Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the rat trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 28:473

Pfister D, De Mulder K, Philipp I, Kuales G, Hrouda M, Eichberger P, Borgonie G, Hartenstein V, Ladurner P (2007). The exceptional stem cell system of *Macrostomum lignano*: screening for gene expression and studying cell proliferation by hydroxyurea treatment and irradiation. *Front Zool* 4:9

Pfister D, De Mulder K, Hartenstein V, Kuales G, Borgonie G, Marx F, Morris J, Ladurner P (2008). Flatworm stem cells and the germ line: developmental and evolutionary implications of macvasa expression in *Macrostomum lignano*. *Dev Biol.* 319:146

Philippe H, Derelle R, Lopez P, Pick K, Borchiellini C, Boury-Esnault N, Vacelet J, Renard E, Houliston E, Quéinnec E, Da Silva C, Wincker P, Le Guyader H, Leys S, Jackson DJ, Schreiber F, Erpenbeck D, Morgenstern B, Wörheide G, Manuel M (2009). Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships. *Curr Biol.* 19:706

Philippe H, Telford MJ (2006). Large-scale sequencing and the new animal phylogeny. *Trends Ecol. Evol.* 21:614

Philippe H, Brinkmann H, Martinez P, Riutort M, Baguñà J (2007). Acoel flatworms are not platyhelminthes: evidence from phylogenomics. *PLoS One.* 2(1):e717.

Pick KS, Philippe H, Schreiber F, Erpenbeck D, Jackson DJ, Wrede P, Wiens M, Alié A, Morgenstern B, Manuel M, Wörheide G (2010). Improved phylogenomic taxon sampling noticeably affects nonbilaterian relationships. *Mol Biol Evol.* 27:1983

Podar M, Haddock SH, Sogin ML, Harbison GR (2001). A molecular phylogenetic framework for the phylum Ctenophora using 18S rRNA genes. *Mol Phylogenet Evol.* 21:218

Prehoda KE (2009). Polarization of *Drosophila* neuroblasts during asymmetric division. *Cold Spring harb. Perspect. Biol.* 1(2):a001388

Protti DA, Llano I (1998). Calcium currents and calcium signaling in rod bipolar cells of rat retinal slices. *J Neurosci.* 18:3715

Putnam NH, Srivastava M, Hellsten U, Dirks B, Chapman J, Salamov A, Terry A, Shapiro H, Lindquist E, Kapitonov VV, Jurka J, Genikhovich G, Grigoriev IV, Lucas SM, Steele RE, Finnerty JR, Technau U, Martindale MQ, Rokhsar DS (2007). Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science.* 317:86

Raineri M, Modenesi P (1986). Preliminary evidence for a cholinergic-like system in lichen morphogenesis. *Histochem J.* 18:647

Ramon y Cajal, S (1937). Recollections of life. (Transl. by E. H. Craigie). *Mem Amer Philos Soc.* 8: 1-638.

Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA (2002). “Stemness”: transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 298: 597

Rebscher N, Zelada-González F, Banisch TU, Raible F, Arendt D (2007) Vasa unveils a common origin of germ cells and of somatic stem cells from the posterior growth zone in the polychaete *Platynereis dumerilii*. *Dev Biol.* 306:599

Rebscher N, Volk C, Teo R, Plickert G (2008). The germ plasm component Vasa allows tracing of the interstitial stem cells in the cnidarian *Hydractinia echinata*. *Dev Dyn.* 237:1736

Reddien PW, Oviedo NJ, Jennings JR, Jenkin JC, Sánchez Alvarado A (2005). SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science.* 310:1327

Renard E, Vacelet J, Gazave E, Labépied P, Borchiellini C, Ereskovsky S (2009). Origin of the neuro-sensory system: new and expected insights from sponges. *Integr Zool.* 4:294

Rentzsch F, Anton R, Saina M, Hammerschmidt M, Holstein TW, Technau U (2006). Asymmetric expression of the BMP antagonists chordin and gremlin in the sea anemone *Nematostella vectensis*: implications for the evolution of axial patterning. *Dev Biol.* 296:375

Rentzsch F, Guder C, Vocke D, Hobmayer B, Holstein TW (2007). An ancient chordin-like gene in organizer formation of *Hydra*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:3249

Rentzsch F, Fritzenwanker JH, Scholz CB, Technau U (2008). FGF signalling controls formation of the apical sensory organ in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Development*. 135:1761

Reverberi G, Ortolani G (1963). On the origin of the ciliated plates and mesoderm in the Ctenophore. *Acta Embryol. Morphol.* 6:175

Reya T (2003). Regulation of hematopoietic stem cell self-renewal. *Recent Prog Horm Res.* 58:283

Ribeiro FM, Black SA, Prado VF, Rylett RJ, Ferguson SS, Prado MA (2006). The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1. *Neurochem.* 97:1

Richards GS, Simionato E, Perron M, Adamska M, Vervoort M, Degnan BM (2008). Sponge genes provide new insight into the evolutionary origin of the neurogenic circuit. *Curr Biol.* 18:1156

Rosner A, Moiseeva E, Rinkevich Y, Lapidot Z, Rinkevich B (2009). Vasa and the germ line lineage in a colonial urochordate. *Dev Biol.* 331:113

Ryan JF, Pang K, Comparative Sequencing Program N, Mullikin JC, Martindale MQ, Baxevanis AD (2010). The homeodomain complement of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* suggests that Ctenophora and Porifera diverged prior to the ParaHoxozoa. *Evodevo.* 1(1):9

Sagane Y, Nakagawa T, Yamamoto K, Michikawa S, Oguri S, Momonoki YS (2005). Molecular characterization of maize acetylcholinesterase: a novel enzyme family in the plant kingdom. *Plant Physiol.* 138:1359

Sahin E, Depinho RA (2010). Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature.* 464:520

Saina M, Genikhovich G, Renfer E, Technau U (2009). BMPs and chordin regulate patterning of the directive axis in a sea anemone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:18592

Sakarya O, Armstrong KA, Adamska M, Adamski M, Wang IF, Tidor B, Degnan BM, Oakley TH, Kosik KS (2007). A post-synaptic scaffold at the origin of the animal kingdom. *PLoS One* 2(6):e506

Sanes DH, Reh TA, Harris, WA (2000). *Development of the nervous system*. Academic Press. San Diego, California, USA. London, UK

Schierwater B, Eitel M, Jakob W, Osigus HJ, Hadrys H, Dellaporta SL, Kolokotronis SO, Desalle R (2009). Concatenated analysis sheds light on early metazoan evolution and fuels a modern "urmetazoon" hypothesis. *PLoS Biol.* 7 (1):e20

- Schmidt T, David CN (1986). Gland cells in *Hydra*: cell cycle kinetics and development. *J. Cell. Sci.* 85:197.
- Schmidt-Rhaesa A (2007). *The evolution of organ systems*. Oxford University Press.
- Schwamborn JC, Berezikov E, Knoblich JA (2009). The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors. *Cell.* 136:913.
- Seipel K, Schmid V (2006). Mesodermal anatomies in cnidarian polyps and medusae. *Int J Dev Biol.* 50:589
- Seipel K, Yanze N, Schmid V (2004). The germ line and somatic stem cell gene Cniwi in the jellyfish *Podocoryne carneae*. *Int J Dev Biol.* 48:1.
- Sharma AK, Nelson MC, Brandt JE, Wessman M, Mahmud N, Weller KP, Hoffman R (2001). Human CD34(+) stem cells express the hiwi gene, a human homologue of the *Drosophila* gene piwi. *Blood* 97:426
- Shestopalov VI, Panchin Y (2009). Pannexins and gap junction protein diversity. *Cell Mol Life Sci.* 65:376
- Shibata N, Umesono Y, Orii H, Sakurai T, Watanabe K, Agata K (1999). Expression of vasa(vas)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians. *Dev Biol.* 206:73
- Shibata N, Rouhana L, Agata K (2010). Cellular and molecular dissection of pluripotent adult somatic stem cells in planarians. *Dev Growth Differ.* 52:27
- Siegrist SE, Doe CQ (2006). Extrinsic cues orient the cell division axis in *Drosophila* embryonic neuroblasts. *Development.* 133:529
- Simon A, Frisén J (2007). From Stem Cell to Progenitor and Back Again. *Cell* 128:825
- Siomi MC, Miyoshi T, Siomi H (2010). piRNA-mediated silencing in *Drosophila* germlines. *Semin Cell Dev Biol.* 21:754
- Simionato E, Ledent V, Richards G, Thomas-Chollier M, Kerner P, Coornaert D, Degnan BM, Vervoort M. (2007). Origin and diversification of the basic helix-loop-helix gene family in metazoans: insights from comparative genomics. *BMC Evol Biol.* 7:33.
- Smith A (2010). Pluripotent stem cells : private obsession and public expectation. *EMBO Mol Med.* 2:113
- Solana J, Lasko P, Romero R (2009). Spoltud-1 is a chromatoid body component required for planarian long-term stem cell self-renewal. *Dev Biol.* 328:410

Song X, Zhu CH, Doan C, Xie T (2002). Germline stem cells anchored by adherens junctions in the *Drosophila* ovary niches. *Science*. 296:1855

Southall TD, Brand AH (2009). Neural stem cell transcriptional networks highlight genes essential for nervous system development. *EMBO J*. 28:3799

Spring J, Yanze N, Middel AM, Stierwald M, Gröger H, Schmid V (2000). The mesoderm specification factor twist in the life cycle of jellyfish. *Dev Biol*. 228:363

Spring J, Yanze N, Jösch C, Middel AM, Winninger B, Schmid V (2002). Conservation of Brachyury, Mef2, and Snail in the myogenic lineage of jellyfish: a connection to the mesoderm of bilateria. *Dev Biol*. 244:372

Srivastava M, Begovic E, Chapman J, Putnam NH, Hellsten U, Kawashima T, Kuo A, Mitros T, Salamov A, Carpenter ML, Signorovitch AY, Moreno MA, Kamm K, Grimwood J, Schmutz J, Shapiro H, Grigoriev IV, Buss LW, Schierwater B, Dellaporta SL, Rokhsar DS (2008). The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans. *Nature*. 454:955

Srivastava M, Simakov O, Chapman J, Fahey B, Gauthier ME, Mitros T, Richards GS, Conaco C, Dacre M, Hellsten U, Larroux C, Putnam NH, Stanke M, Adamska M, Darling A, Degnan SM, Oakley TH, Plachetzki DC, Zhai Y, Adamski M, Calcino A, Cummins SF, Goodstein DM, Harris C, Jackson DJ, Leys SP, Shu S, Woodcroft BJ, Vervoort M, Kosik KS, Manning G, Degnan BM, Rokhsar DS (2010). The *Amphimedon queenslandica* genome and the evolution of animal complexity. *Nature*. 466:720

Suda T, Arai F (2008). Wnt signaling in the niche. *Cell*. 132:729

Sukhanova MJ, Du W (2008). Control of cell cycle entry and exiting from the second mitotic wave in the *Drosophila* developing eye. *BMC Dev Biol*. 8:7

Sunanaga T, Saito Y, Kawamura K (2006). Postembryonic epigenesis of Vasa-positive germ cells from aggregated hemoblasts in the colonial ascidian, *Botryllus primigenus*. *Dev Growth Differ*. 48:87

Suzuki A, Raya A, Kawakami Y, Morita M, Matsui T, Nakashima K, Gage FH, Rodríguez-Esteban C, Izpisúa Belmonte JC (2006). Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:10294

Szakmary A, Cox DN, Wang Z, Lin H (2005). Regulatory relationship among piwi, pumilio, and bag-of-marbles in *Drosophila* germline stem cell self-renewal and differentiation. *Curr Biol*. 15:171

Tamm SL (1982). Ctenophora. Dans G.A.B. Shelton (ed.). *Electrical Conduction and Behaviour in "Simple" Invertebrates*. Clarendon Press, Oxford. p. 266

Takahashi K, Yamanaka S (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126:663

Takahashi T, Hamaue N (2010). Molecular characterization of *Hydra* acetylcholinesterase and its catalytic activity. *FEBS Lett.* 584:511

Teo R, Möhrlen F, Plickert G, Müller WA, Frank U (2006). An evolutionary conserved role of Wnt signaling in stem cell fate decision. *Dev Biol.* 289:91

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

Thomson T, Lin H (2009). The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 25:355

Thor S, Thomas JB (2002). Motor neuron specification in worms, flies and mice: conserved and 'lost' mechanisms. *Curr Opin Genet Dev* 12:558

Tiozzo S, Brown FD, De Tomaso AW (2007). Regeneration and stem cells in ascidians. in *Stem Cells: From Hydra to Man*. Thomas Bosch (Ed). Springer Science. p.95

Towers PR, Edwards B, Richmond JE, Sattelle DB (2005). The *Caenorhabditis elegans* lev-8 gene encodes a novel type of nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit. *J Neurochem.* 93:1

Vagin VV, Klenov MS, Kalmykova AI, Stolyarenko AD, Kotelnikov RN, Gvozdev VA (2004). The RNA interference proteins and vasa locus are involved in the silencing of retrotransposons in the female germline of *Drosophila melanogaster*. *RNA Biol.* 1:54

Venezia TA, Merchant AA, Ramos CA, Whitehouse NL, Young AS, Shaw CA, Goodell MA (2004). Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol* 2: e301.

Vigh-Teichmann I, Vigh B (1983). The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Arch Histol Jpn.* 1983 46:427

Voskoboinik A, Soen Y, Rinkevich Y, Rosner A, Ueno H, Reshef R, Ishizuka KJ, Palmeri KJ, Moiseeva E, Rinkevich B, Weissman IL (2008). Identification of the endostyle as a stem cell niche in a colonial chordate. *Cell Stem Cell* 3:456

- Wainright PO, Hinkle G, Sogin, ML, Stickel, SK (1993). Monophyletic origins of the metazoan: an evolutionary link with fungi. *Science*. 260:340
- Wallace K, Liu TH, Vaessin H (2000). The pan-neural bHLH proteins DEADPAN and ASENL regulate mitotic activity and cdk inhibitor dacapo expression in the *Drosophila* larval optic lobes. *Genesis*. 26:77
- Wang CQ, Jacob B, Nah GS, Osato M (2010). Runx family genes, niche, and stem cell quiescence. *Blood Cells Mol Dis.* 44:275
- Watanabe H, Fujisawa T, Holstein TW (2009). Cnidarians and the evolutionary origin of the nervous system. *Dev Growth Differ.* 51:167
- Webster PJ, Liang L, Berg CA, Lasko P, Macdonald PM (1997). Translational repressor bruno plays multiple roles in development and is widely conserved. *Genes Dev.* 11:2510
- Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Kirkpatrick CJ (2001). The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. *Jpn J Pharmacol.* 85:2
- Wessler I, Reinheimer T, Kilbinger H, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Saloga J, Knop J (2003). Increased acetylcholine levels in skin biopsies of patients with atopic dermatitis. *Life Sci.* 2003
- Whim MD, Church PJ, Lloyd PE (2003). Functional roles of peptide cotransmitters at neuromuscular synapses in *Aplysia*. *Mol Neurobiol.* 7:335.
- Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessel T, Lawrence P, Meyerowitz E (1999). *Biologie du développement. Les grands principes*. Traduction française: Jacqueline Souchon. Dunod. Paris.
- Yamada A, Martindale MQ (2002). Expression of the ctenophore Brain Factor 1 forkhead gene ortholog (ctenoBF-1) mRNA is restricted to the presumptive mouth and feeding apparatus: implications for axial organization in the Metazoa. *Dev Genes Evol.* 212 :338.
- Yamada A, Pang K, Martindale MQ, Tochinai S (2007). Surprisingly complex T-box gene complement in diploblastic metazoans. *Evol Dev.* 9 :220
- Yamada A, Martindale MQ, Fukui A, Tochinai S (2010). Highly conserved functions of the Brachyury gene on morphogenetic movements: insight from the early-diverging phylum Ctenophora. *Dev Biol* 339:212
- Yamada T, Fujii T, Kanai T, Amo T, Imanaka T, Nishimasu H, Wakagi T, Shoun H, Kamekura M, Kamagata Y, Kato T, Kawashima K (2005). Expression of acetylcholine (ACh) and ACh-synthesizing activity in Archaea. *Life Sci.* 77:1935

Yamamoto K, Oguri S, Momonoki YS (2008). Characterization of trimeric acetylcholinesterase from a legume plant, *Macroptilium atropurpureum*. *Urb. Planta.* 227:809

Yamashita YM, Yuan H, Cheng J, Hunt AJ (2010). Polarity in stem cell division: asymmetric stem cell division in tissue homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a001313, 14p.

Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell.* 115:281

Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature.* 453:519

Zeng H, Yücel R, Kosan C, Klein-Hitpass L, Möröy T (2004). Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. *EMBO J.* 23:4116

Zigmond MJ (1999). Otto Loewi and the demonstration of chemical neurotransmission. *Brain Res Bull.* 50:347

Zrzavy, J., Mihulka, S., Kepka, P. & Bezdek, A. (1998). Phylogeny of the Metazoa based on morphological and 18S ribosomal DNA evidence. *Cladistics* 14: 49.

## Annexe 1.

Article 4 : New insights on ctenophore neural  
anatomy : immunofluorescence study in  
*Pleurobrachia pileus* (Müller, 1776)

## **1. Title page**

# **New insights on ctenophore neural anatomy: immunofluorescence study in *Pleurobrachia pileus* (Müller, 1776)**

Muriel Jager<sup>a§</sup>, Roxane Chiori<sup>a§</sup>, Alexandre Alié<sup>a</sup>, Cyrielle Dayraud<sup>a</sup>, Eric Quéinnec<sup>a\*</sup> and Michaël Manuel<sup>a</sup>

<sup>§</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>a</sup> Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR 7138 CNRS UPMC MNHN IRD,  
Case 05, 7 quai St Bernard, 75005 Paris, France.

\* Author for correspondence

E-mail: eric.queinnec@snv.jussieu.fr

**Total number of text figures: 7**

**Abbreviated title:** Ctenophore neuro-anatomy

---

\* Correspondence to: Eric Queinnec, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR 7138 CNRS UPMC MNHN IRD, Case 05, 7 quai St Bernard, 75005 Paris, France.

E-mail: eric.queinnec@snv.jussieu.fr; Telephone: (33) 1 44 27 31 47

## 2. Abstract

Ctenophores are non-bilaterian animals sharing with cnidarians and bilaterians the presence of sensory receptors, nerve cells and synapses, absent in placozoans and sponges. Whereas recent immunofluorescence studies have renewed our knowledge of cnidarian neuro-anatomy, ctenophores have been much less investigated despite their importance to understanding the origin and early evolution of the nervous system. Here, the neuro-anatomy of the ctenophore *Pleurobrachia pileus* (Müller, 1776) was explored by whole-mount fluorescent antibody staining using antibodies against tyrosylated  $\alpha$ -tubulin, FMRFamide and vasopressin. We describe the morphology of nerve nets and their local specialisations, and the organisation of the aboral neuro-sensory complex comprising the apical organ and polar fields. Two distinct nerve nets are distinguished: a mesogleal nerve net, loosely organised, throughout body mesoglea, and a much more compact “nerve net” with polygonal meshes in the ectodermal epithelium. The latter is organised as a plexus of short nerve cords. This epithelial nervous system contains distinct sub-populations of dispersed FMRFamide and vasopressin immunoreactive nerve cells. In the aboral neuro-sensory complex, our most significant observations include specialised nerve nets underlying the apical organ and polar fields, a tangential bundle of actin-rich fibres (interpreted as a muscle) within the polar fields, and distinct groups of neurons labelled by anti-FMRFamide and anti-vasopressin antibodies, within the apical organ floor. These results are discussed in a comparative perspective.

### **3. Text**

#### Introduction

The acquisition of the nervous system was a key event in animal evolution, providing the basis for sophisticated integration of environmental cues and active behaviours. Nervous systems reach their highest anatomical and functional complexity in the Bilateria, but typical nerve cells and both kinds of synapses (chemical and electrical) are also present in the two non-bilaterian phyla Ctenophora and Cnidaria. Cytological and physiological data suggest homology between these cnidarian/ctenophore nerve cells and their bilaterian counterparts (Bullock et al., '65) and this hypothesis has received additional support from recent molecular studies showing the expression of several homologues of bilaterian neural genes in cnidarian neuro-sensory cells (reviews in Galliot et al., 2009; Watanabe et al., 2009).

Neural cells were probably acquired only once in animal evolution, in a common ancestor of ctenophores, cnidarians and bilaterians (Eumetazoa), whilst sponges and placozoans are the only nerve-less metazoans. The branching order of the earliest metazoan lineages remains controversial, with some recent molecular phylogenies casting doubt on this scenario (see Dunn et al., 2008; Schierwater et al., 2009; Miller, 2009). However, in line with classical views, analyses of a phylogenomic dataset optimised for species sampling of the non-bilaterian lineages (Philippe, Derelle et al., 2009) lent support to eumetazoan monophyly and thereby to a single origin of the nervous system (as well as of muscle cells). Another significant outcome of the same study was a sister-group relationship of ctenophores and cnidarians rehabilitating the old “coelenterate” group (also obtained by Schierwater et al., 2009).

A good knowledge of the neural features of cnidarians and ctenophores is critical for reconstructing the earliest steps of nervous system evolution. While recent investigations using modern tools such as immunofluorescent antibody staining or gene *in situ* hybridisation have provided a renewed picture of cnidarian neuro-anatomy, much less is known about the ctenophore nervous system. Therefore, it remains unclear to what extent ctenophores share with cnidarians the same fundamental neuro-anatomical characteristics, a particularly important question in the context of a supposed sister-group relationship between these two groups (Philippe, Derelle et al. 2009). In a previous work (Jager et al. 2008), we have started to characterise elements of the neuro-sensory system at the molecular level, in the adult ctenophore *Pleurobrachia pileus* (Fig. 1A) (the sea gooseberry, order Cydippida), using genes of the SOX family as markers. In the present study, we make a contribution to improving our understanding of ctenophore neuro-anatomy by using immunofluorescence.

Previous studies using histological techniques (Chun 1880; Eimer, 1880; Hertwig 1880; Samassa 1892; Bethe, 1895; Heider, '27) or electron microscopy (Horridge and Mackay, '62, '64; Horridge, '65; Hernandez-Nicaise '73a, b, c, '74; Tamm and Tamm, '95, 2002) have described the ctenophore nervous system as consisting mainly of a polygonal plexus integrated in the ectodermal epithelium, usually called the “subepithelial nerve net” (e.g. Hernandez-Nicaise, '91) and here referred to as the “polygonal nerve net” (to avoid using the ambiguous term “subepithelial”) (Fig. 1B). The existence of an additional nerve net located in the mesoglea is not firmly established. For example, Hernandez-Nicaise ('73b) could detect nerve fibres, but no nerve cell bodies, in the body mesoglea of *Beroe*. In other investigated ctenophores species (e.g. *Pleurobrachia rhodopis*, *Lampetia pancerina* and *Callianira bialata*; Hernandez-Nicaise, '91), a specialised axial nerve cord has long been described in the tentacle mesoglea, but neural cells have never been observed in the body mesoglea.

At the cellular level, ctenophore neurons have been classified as bipolar (i.e. cell body bearing two outgrowths or neurites) and multipolar (with more than two neurites) (Hernandez-Nicaise, '73a). In addition, two types of sensory neurons distributed throughout the epidermis have been described (Fig. 1B)( Hernandez-Nicaise, '91). The first type, called ciliated sensory cells (or "vibroreceptors") is characterised by the presence of a single non-motile cilium with a rather complex root. Hoplocytes, the second type of sensory neurons, bear one to several actin-rich apical peg(s) occasionally accompanied by a cilium.. At their basal extremity, both types of sensory cells have neurites that establish synapses with neurons of the polygonal nerve net (Hernandez-Nicaise, '74; Hernandez-Nicaise, '91).

Ctenophore synapses are uniquely characterised by their "triadic" pre-synaptic morphology, with tight association of a vesicle row, a specialised portion of endoplasmic reticulum, and one to several large mitochondria (Hernandez-Nicaise, '73c). The nature of molecules involved in neuro-transmission remains unknown, but the presence of FMRFamide immunoreactivity in neurons has been previously reported (Grimmelikhuijzen et al., '83, '89b). Ctenophore neurons can establish synapses with various kinds of effector cells, mainly gland cells, ciliated epithelial cells and muscle cells. The latter are true muscle fibres without a distinct epithelial cell body (an important difference with cnidarians, Hernandez-Nicaise, '91) and they occur in the basal region of the ectodermal epithelium (parietal muscle) as well as within the mesoglea (mesogleal muscle) (Hernandez-Nicaise, '91 and our unpublished TEM observations in *Pleurobrachia pileus*) (Fig. 1B).

There are local differentiations of the nervous system, particularly in relation to specialised ciliated epidermal structures (Hernandez-Nicaise, '84) (Fig. 1A). Such specialisations of the ciliated epithelia include the eight longitudinal rows of swimming paddles or combs used for locomotion, each comb comprising several hundreds of tightly linked cilia. Experimental evidence (reviewed in Tamm, '82)

indicates that propagation of beating waves along the comb rows does not involve neural transmission, but the nervous system modulates their beating frequency upon environmental stimulation or during particular behaviours. Ctenophores detect gravity (and probably other kinds of environmental stimuli) thanks to a complex sensory organ (the apical organ) located at their aboral pole (Tamm, '82). The apical organ is essentially made of various types of ciliated cells, including four groups of multiciliated cells called the balancer cells, supporting a mineralised statolith. Each balancer functions as a pace maker controlling the beating frequency of a pair of comb rows through special strands of epidermal ciliated cells (ciliated grooves) (Tamm, '82). Many synapses have been described in the apical organ epithelial floor (Hernandez-Nicaise, '73a, '74) but the organisation of the associated nervous system is not known. The apical organ is flanked by two tong-shape ciliated areas, the polar fields, extending in the pharyngeal plane. Their organisation and functional significance remain unclear, but the expression of the *PpiSox3* gene revealed the presence of putative sensory organs ("Z bodies") aligned in the marginal zone of the polar fields (Jager et al., 2008). Another important feature of the ctenophore body plan is the presence of a pair of tentacles (absent in some groups, e.g. Beroida) used for catching preys and covered with specialised sticking cells (colloblasts), thought by some to be highly modified ciliated cells (Hernandez-Nicaise, '91).

In the present study, we re-explored the neuro-anatomy of the adult ctenophore *Pleurobrachia pileus* using antibodies directed against tyrosylated  $\alpha$ -tubulin (a modified form of tubulin abundant in neurons; Hammond et al., 2008), FMRFamide and vasopressin. The FMRFamide-like peptides or FLPs have widely been found as neurotransmitters or neuromodulators in all metazoan phyla with the exception of echinoderms (Grimmelikhuijzen et al., '96; Watanabe et al., 2009; Walker et al., 2010). The vasopressin-like neuropeptides (comprising oxytocins and vasopressins) are evolutionarily well conserved and have been identified in nervous system of various protostomes, cnidarians and vertebrates (Grimmelikhuijzen et al., '82; Caldwell et al., 2008; Bardou et al., 2009). Compared to classical histology approaches, whole-mount immuno-detection offers a more precise labelling of cell

types (depending on the specificity of the antibody) and a better view of three-dimensional organisation. This study is focused on neurons and neural structures and does not describe the types and distribution of epithelial sensory cells, which would deserve separate investigation. Furthermore, we did not investigate the nervous system associated with the endoderm. We provide the first evidence for the existence of a body mesogleal nerve net and for neuronal type specialisation with respect to putative neurotransmitters in ctenophores. Furthermore, our observations highlight the structural complexity of the ctenophore body plan, with several structures being newly described, notably in the aboral sensory complex.

## Materials and Methods

### Specimen collection

Adult specimens of *Pleurobrachia pileus* were collected using plankton nets in Villefranche-sur-mer (France) during their reproductive season, between March and June. They were transferred into filtered natural seawater and kept at 16°C.

### Immunofluorescence

Animals were immersed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.5). After fixation for 15 min, at room temperature, the samples were washed several times in PBS, dehydrated through a graded series of ethanol and stored in methanol at -20°C. After stepwise re-hydration to PBS, samples were permeabilized with Triton-X100 (0.2% in PBS, then 0.01% in PBS, 10 min at room temperature). After blocking with 1% bovine serum albumin, samples were incubated with one or two of the following primary antibodies for at least 2 hours at room temperature: rat monoclonal anti-tyrosylated α-tubulin or YL1/2 antibody (1:1000 dilution, Serotec), rabbit polyclonal anti-FMRFamide (1:1000 dilution, Abcam) and rabbit polyclonal anti-vasopressin (1:20 dilution, Abcam). The anti-FMRFamide and anti-vasopressin antibodies were pre-absorbed with *Pleurobrachia* tissue to reduce cross-reactivity. After washing with PBS triton-X100 0.01% (PBST), samples were incubated overnight at 4°C with the appropriate secondary antibodies: Alexa Fluor ® 568 goat anti-rat IgG and/or Alexa Fluor ® 488 goat anti-rabbit IgG (Molecular probes). Dilutions of primary and secondary antibodies were made using 1X PBS containing 0.01% Triton-X100 (PBST). Specimens for phalloidin staining were fixed but not dehydrated. They were incubated for 45 mn in a dilute Phalloidin-TRITC (Sigma) solution (10 µg/ml

in PBST) and rinsed three times in PBST. All samples were finally stained with DAPI (1 $\mu$ g/ml) for 15 mn for DNA visualisation, and then washed three times for 15 mn in PBST.

Before mounting in Vectashield ® solution, animals were micro-dissected. The epithelium was cut longitudinally between adjacent comb rows, and the specimens were spread out on a microscope slide, with the apical region in the centre. All fluorescence and DIC images were performed using a microscope (Olympus BX61) with a Q-imaging Camera using Image Pro plus software ® (Mediacybernetics). To enhance fine details, Higauss filter was used on each picture (from Image Pro). Confocal microscopy was performed using a Leica SP5 microscope.

## Results

### Characterisation of polygonal (epithelial) and mesogleal nerve nets

The anti-tyrosylated- $\alpha$ -tubulin antibody (YL1/2) acts as an accurate marker of nerve cells, owing to the abundance of microtubules present in these cells (Hernandez-Nicaise '74). It also stains several additional cell types (sensory cells, glandular cells, muscle cells), generally with lower intensity. Neural cells are identified by their characteristic shape (with cell body and thin elongated neurites). Using the YL1/2 antibody, we could distinguish two different nerve nets in the adult ctenophore, as summarised in Fig. 1B.

Throughout the epidermis, the YL1/2 antibody reveals a conspicuous epithelial nerve net (Fig. 2A-B'). This nerve net has been called "subepithelial" in the literature (Hernandez-Nicaise, '91) and according to previous TEM investigations it is located in the basal region of the epidermal cell layer, with its neural cell bodies and neurites being interspersed between other epidermal cell types (i.e. typical epithelial cells, glandular cells, sensory cells, parietal muscle cells...). In our YL1/2-stained preparations its polygonal meshes are irregular in shape and size, their diameter ranging from about 25  $\mu\text{m}$  to about 130  $\mu\text{m}$  (Fig. 2A-B), as previously described (Hernandez-Nicaise, '91). Most neurites are arranged in parallel bundles, so that the polygonal nerve net is not a network of single neurites, but of short "nerve cords" each comprising several (2 to 5) parallel neurites (Fig. 2A-A'-B). Nerve cell bodies (recognisable by their nuclei in Dapi counter-staining) are sometimes placed at nodes, but many nodes of the network lack a cell body, and many of the nerve cell bodies lie along the network interconnections (i.e. the segments linking two nodes) (Fig. 2B Ncb). Besides the main neural network, many isolated multipolar nerve cells are observed within the meshes (Fig. 2A-B'). Their neurites

generally connect with the polygonal nerve net (Fig. 2A-B', white arrowheads). Some of these isolated nerve cells bear a short cilium on their cell body (Fig. 2B'). These ciliated neurons, observed throughout the epidermis, are clearly distinct from the previously described sensory cells (vibroreceptors and hoplocytes) by (i) the shortness of their cilium (much longer in vibroreceptors), (ii) the absence of an actin-rich peg (present in hoplocytes), (iii) the orientation of the cilium, not exposed to the external environment and projecting laterally or even in some cases towards the mesoglea (not shown).

A second nerve net was detected in the depth of the body mesoglea by YL1/2 staining (Fig. 2 C-D and supp. Movie 1). Unlike the subepidermal nerve net, the mesogleal nerve net is a network of single neurites and thereby its organisation is much more loose. The cell bodies are small (3-3.5 $\mu$ m) and multipolar (Fig. 2C-D). In confocal (Fig. 2C) as well as conventional microscopy (Fig. 2D), staining of the neurites is discontinuous in the form of many aligned little puncta. This aspect could reflect either compositional difference between labile and stable microtubule domains along the neurites as documented for mammalian axons (Brown et al. '93) or artefactual modification of  $\alpha$ -tubulin structure upon fixation. It is nevertheless clear that these mesogleal cells are organised in network (Fig. 2C) and that some of the neurites end in close contact with mesogleal muscle fibres (Fig. 2D). This mesogleal nerve net could be detected in all parts of the body, its density being higher in some particular regions (e.g. near the tentacle opening and close to the aboral sensory complex). We failed to detect clear connections between the epithelial and mesogleal nervous systems.

Since previous works on *Pleurobrachia* described mesogleal nervous components in the tentacles only, but failed to observe a nerve net throughout the body mesoglea (Hernandez-Nicaise, '91), we wanted to check if the mesogleal nervous system of tentacles was also stained using the same anti- $\alpha$ -tubulin antibody. Two parallel nerve cords were stained with high intensity within the tentacle (Fig.

2E, E'). In confocal microscopy views (Fig. 2E') these nerve cords clearly appeared embedded into the mesogleal tentacle musculature. We also observed thin transverse connections between the two nerve cords (Fig. 2E). These results confirm that YL1/2 immunofluorescence is a convenient tool for visualisation of the ctenophore mesogleal nervous system

In addition to nerve cells, the mesoglea also contains muscle fibres and various types of “mesenchyme cells” (Delage and Herouard, '01; Hyman, '40; Hernandez-Nicaise, '68a; Franc, '85) of unknown function. Because some of the mesenchyme cells bear thin processes, at first sight they could be confounded with neurons. We found that phalloidin staining offers a very efficient criterion for distinguishing between mesogleal neurons and mesenchyme cells, the latter being intensely stained with phalloidin while neurons are not (see YL1/2 + phalloidin counterstaining in Fig. 2D and Fig. 2F). That mesenchyme cells have higher actin content is likely to reflect more intense cellular dynamics, compared to neurons, consistent with previous data suggesting that mesenchyme cells are highly mobile within the mesoglea (Franc, '85).

Among mesenchymal cells, we were able to recognise three main types (Fig. 2G-I). The first type is characterised by numerous long pseudopodial processes radiating from the cell body (Fig. 2G, and 2F on the top). Although their morphology is somewhat neural-like, their cell bodies and processes are not only  $\alpha$ -tubulin-rich (stained by YL1/2 antibody) but also actin-rich (stained by phalloidin). These cells are present at higher density in the most superficial region of the mesoglea, between the epidermis and the mesogleal nerve net (supp. Movie 1) and they accumulate in huge numbers under cicatrising portions of epithelium after healing (unshown observations). All these features unambiguously point to the “vacuolated cells” described by Franc ('85). The two remaining mesenchymal cell types are phalloidin-positive but YL1/2 negative. Some have a more or less ovoid shape and no process (Fig. 2H); they are not abundant and might correspond to the “clear cells”

(Franc, '85). A last and much more abundant cell type is represented by elongated and sometimes ramified multinucleated cells (Fig. 2I). They probably correspond to the “filamentous cells” of Franc ('85), hypothesised by this author to be the precursors of mesogleal muscle fibres.

### **Local specialisations of the polygonal nerve net**

Local morphological differentiations (Fig. 3) of the polygonal nerve net can result from higher polygons density, thickening of polygon segments, preferential orientation of the polygons, or a combination of these three types of modification.

A first example of such condensations is the “tentacle nerve” (Hernandez-Nicaise, '73a,'91), a linear thickening integrated in the design of the polygonal nerve net, in the tentacular plane (Fig. 3A-D). In fact, it is a nerve cord, not a nerve, and to avoid confusion with the mesogleal nerve cords present in the tentacle itself (see above and Fig. 2E-E’), we propose to rename this structure “juxtapentacular nerve cord”. It extends along the tentacular plane from the vicinity of the apical organ (Fig. 3A, white arrows) to the tentacle sheath (Fig. 3B) and then down to the oral hemisphere. The number of neurites comprised in the juxtapentacular nerve cord is difficult to estimate from whole-mount preparations but is clearly higher than five (see Fig. 3C). Interestingly, nerve cell bodies are not scattered along the juxtapentacular nerve cord but instead concentrated in small groups of 3-4 cells as revealed by DAPI staining (arrowheads in Fig. 3C).

We constantly observed that the juxtapentacular nerve cord becomes progressively thinner at its aboral extremity and finally vanishes within the polygonal nerve net, at some distance from the apical organ

(Fig. 3A, 3D). Therefore, contrary to former suggestions (Hernandez-Nicaise, '74, '91), it does not reach the apical organ. This nevertheless does not imply absence of a preferential communication pathway between the apical organ and the tentacle through the polygonal network, but this pathway if it exists is not morphologically identifiable in YL1/2-stained preparations.

In the aboral region, several kinds of modifications are observable. In the tentacular plane, mesh density of the polygonal nerve net increases close to the apical organ, without particular change in the orientation or thickness of the connecting segments (Fig. 3A). Close to the polar fields, meshes are elongated and parallel to the polar field edges (Fig. 3E). Furthermore, the polygonal nerve net differentiates a continuous "external circum-polar nerve cord" (Jager et al., 2008) that encircles the polar fields (Fig. 3E and E').

Along the ciliated grooves, we observed preferential orientation of the meshes, and a thin nerve cord-like structure running along each side of the ciliated groove (Fig. 3F-G, arrows). We could detect neurites crossing the ciliated groove and linking together both nerve cords (Fig. 3G, arrowheads), consistent with previous observations (Hernandez-Nicaise, '73a).

Similar longitudinal orientation of the meshes was also observed within the comb rows between two successive comb plates (Fig. 3H). But, there, interconnecting segments of the network are not particularly thickened (Hernandez-Nicaise, '91). Finally, near the mouth, the polygonal nerve net is also modified with meshes being smaller and orientated parallel to the mouth margin (Fig. 3I).

#### **Distinct epithelial nerve cell populations revealed by anti-neuropeptide antibodies**

By using antibodies directed against neuropeptides, concomitantly with the structural marker YL1/2, we could identify various sub-populations of nerve cells within the epithelium (Fig. 4). With these anti-neuropeptide antibodies the staining appears discontinuous in the form of several puncta scattered within cell bodies and aligned along the neurites. We failed to detect positive mesogleal neurons with these anti-neuropeptides antibodies.

The anti-FMRFamide antibody revealed (i) a small subset of neurons integrated into the polygonal network itself, strongly counter-stained by YL1/2 (yellow colour on Fig. 4A, 4A'); and (ii) isolated nerve cells sparsely distributed throughout the epithelium, within the meshes of the polygonal nerve net, and only weakly stained by the YL1/2 antibody (green colour on Fig. 4A, 4A''). These anti-FMRFamide positive neurons have small cell (between 4 to 5  $\mu$ m). They are markedly more abundant near the ciliated grooves (Fig. 4A).

Throughout the epithelium, the anti-vasopressin antibody stains a much denser nerve cell sub-population than the anti-FMRFamide antibody (Fig. 4B). In addition, anti-vasopressin positive cell bodies are larger (between 6 to 8  $\mu$ m), and many of them bear a short and thin cilium (Fig. 4B', Vc). These ciliated anti-vasopressin immunoreactive cells are dispersed throughout the epithelium and they closely look like the ciliated neurons described previously (Fig. 2B'). Again, these anti-vasopressin positive neurons are either integrated in the main polygonal network, or isolated within the meshes (Fig. 4B-B'). In the former case, we never observed more than a single anti-vasopressin positive neurite per network segment, implying that anti-vasopressin positive and negative neurons co-exist within a given segment.

## **Anti-neuropeptide and anti-tyrosylated- $\alpha$ -tubulin antibodies reveal different neural structures in the apical organ floor**

In the epithelial floor (Hernandez-Nicaise, '91) of the apical organ (AO), our immunohistochemical investigation highlights a deep nerve net and several previously undescribed neural structures (Fig. 5 and 6). The precise localisation of these structures can be described and compared thanks to the positional markers provided by DIC views (Fig. 5A) and Dapi counter-staining (Fig. 5B-B'). Examples of such positional markers include the four balancers (B in Fig. 5A,B,B'), the lithocytes (Lt in Fig. 5B'), the four "refringent bodies" (Rb in Fig. 5A,B,B'), the two epithelial papillae (Ep in Fig. 5B'), and two regular rows of superficial nuclei, located in the AO floor between the refringent bodies, along the pharyngeal plane (Fig. 5B') (see also Jager et al. 2008).

A close examination of the AO floor stained by YL1/2 reveals the presence of a deep nerve net (Fig. 5C). Since basal laminae are not visible in our preparations, it is not possible to determine if this nerve net is located in the basal portion of the AO epidermis, or in the superficial region of the underlying mesoglea. This nerve net is mostly restricted to the region delimited by the four groups of balancer cells (Fig. 5C), but with lower density in the very central AO area. Within the AO nerve net, neurites are preferably orientated in two perpendicular directions corresponding to the pharyngeal and tentacular planes (Fig. 5C). The AO nerve net is markedly looser than polygonal nerve net described above, since neurites are not associated in bundles. However, in the tentacular plane, the AO nerve net seems continuous with the polygonal nerve net surrounding the AO (Fig. 5C white arrowheads). A large proportion of the deep AO nerve net is stained by the anti-FMRFamide antibody (Fig. 5D), with clear co-localisation of YL1/2 + anti-FMRFamide in some neurites (Fig. 5D').

In addition to these neurons integrated in the AO deep nerve net, anti-FMRFamide antibody staining revealed a complex pattern of condensed (putatively neuro-sensory) structures integrated in the thick epithelial floor of the apical organ (shown in Fig. 6A and B and schematised in Fig. 6C). First, we observed four symmetrical intensely stained structures, lying adjacent to the balancer cells (black stars in Fig. 5D and white stars in 6A-B). Profile views (Fig. 6B and B') indicate that these structures span the entire thickness of the epithelium and are obliquely orientated, their basal extremity being more peripheral than their apical extremity. Both extremities are stained with particularly high intensity. Higher magnification views (Fig. 6B') and confocal microscopy (Supp. Movie 2) reveal that these structures are made of numerous neurite-like processes weaved between cells nuclei. Additional structures stained by anti-FMRFamide antibody in the AO floor include the four refringent bodies (with low intensity), and four thin superficial lines (white arrows in Fig. 6A-B) running from the refringent bodies to the border of the apical organ, parallel to the pharyngeal plane. A movie displaying a three-dimensional view of the structures stained by anti-FMRFamide in the apical organ is provided in supp. Data. (supp. Movie 2).

Several anti-vasopressin immunoreactive structures were also observed in the AO floor (Fig. 6D-F): (i) close to each balancer, but not directly against it, four thick structures spanning the whole thickness of the apical organ floor (Black stars in Fig. 6D – apical view – and in Fig. 6E – profile view). Based on their position with respect to balancer cells, they are distinct from the FMRFamide immunoreactive structures indicated by white stars in Fig. 6A; (ii) close to these structures, but more internal, two lines parallel to the tentacular plane and also spanning the whole epithelium thickness (white stars in Fig. 6D and 6E); and (iii) close to the AO peripheral border, in the pharyngeal plane, two symmetrical V-shape structures closely apposed to the epithelial papillae but clearly distinct from them (white arrowheads in Fig. 6D and 6E). A movie displaying three-dimensional view of the structures stained by anti-vasopressin antibody in the apical organ is provided in supp. Data. (supp. Movie 3).

## **Complex nervous system associated with the polar fields**

The organisation of the nervous system associated with the polar fields was investigated with the same antibodies (Fig. 7). According to the few available histological studies, some hypothetical nervous elements may be present (Hertwig, 1880) but no sensory or nerve cells have been clearly identified until recently (Jager et al., 2008). The marginal zone of the polar field is characterized by cells bearing a single long cilium (Hertwig 1880) and forming a thickened rim around the central zone. In the central zone, epithelial cells bear several agglomerated cilia that create a continuous flow of sea-water into the AO (Chun, 1880; Hertwig, 1880; Hernandez-Nicaise, '74, '84).

YL1/2 staining reveals conspicuous neuro-sensory structures distributed along the inner border of the marginal zone (Fig. 7A-B-C). These structures consist of several cells and have been previously described and named “Z bodies” (Fig. 7B-C, white stars; Jager et al., 2008). Each Z body sends many thin neurite-like processes towards the periphery of the polar field (Fig. 7B-C). Z bodies are more densely packed near the AO (Fig. 7A). They are connected with each others by neurites as previously described (“internal circum-polar nerve ring” in Jager et al. 2008) (Fig. 7B-C arrowheads).

Along the polar field axis, YL1/2 also reveals a bundle of parallel fibres (Pfm in Fig. 7A-E), strongly stained by phalloidin (Fig. 7D) and thereby probably of muscular nature. They extend over the whole length of the polar fields, ending at some distance from their extremities (Fig. 7A, C, D). These fibres seem to lie on the same optical plane as the epithelial cells (unshown observations) and therefore are probably parietal muscle fibres.

Finally, we observed by YL1/2 antibody staining a superficial nerve net, in both the marginal and the central zones (Fig. 7E). This “polar field nerve net” is not polygonal and is markedly less condensed than the epithelial nerve plexus found in other parts of the body, but it nevertheless appears denser than the mesogleal nerve net. Some neurites seem to contact polar field muscle fibres (Fig. 7E white arrowhead). Other neurites extend towards the AO floor, in the vicinity of the dome orifice (Fig. 7F white arrowhead). Due to technical limitations we could not determine if this polar field nerve net is located above or below the basal lamina.

Some components of the polar field nervous system exhibit immunoreactivity with the anti-FMRFamide antibody (Fig. 7E', G-H). In the marginal zone, anti-FMRFamide staining is closely associated with the Z bodies (Fig. 7G, H), but does not co-localise with YL1/2 staining. A movie displaying three-dimensional view of the FMRFamide immunoreactive structures in the polar field proximal region is provided in supp. Data. (supp. Movie 4). In the most distal region of the polar fields, there is no FMRFamide signal associated with the Z bodies (not shown). In the central polar field zone, some isolated cells of the nerve net are also anti-FMRFamide reactive (Fig. 7E'). No signal could be detected in the polar fields with the anti-vasopressin antibody. Elements of the polar field nervous system and the polar field muscle are positioned on a diagram (Fig. 7I).

## Discussion

### The characteristics of *Pleurobrachia* nerve nets in a comparative perspective

The non-specialised component of the *Pleurobrachia* nervous system comprises two nerve nets with sharply distinct localisation and organisation: the polygonal nerve net, integrated in the epidermal cell layer, and the mesogleal nerve net (Fig. 1B). Thanks to the immunofluorescence approach, we could for the first time establish the existence of a mesogleal nerve net extending throughout the body wall of a cydippid ctenophore (Fig. 1B, 2C-D). By electron microscopy, Hernandez-Nicaise ('73b) could detect nerve fibres, but no nerve cell bodies, in the body mesoglea of the non-cydippid *Beroe*. In the Cydippidae, mesogleal neural elements had been previously reported only in the tentacle (Hernandez-Nicaise, '73b, '91). The presence in ctenophores of an extensive nerve net running through the mesoglea was not unexpected given that these animals also possess truly mesogleal muscle fibres, of mesodermal embryonic origin (Martindale and Henry '97, '99) and without any epithelial cell component. Moreover, we obtained evidence suggesting that these mesogleal muscles are innervated by some of the mesogleal neurons (Fig. 2D). The mesogleal nervous system is more condensed in the tentacle where it mainly consists of two parallel nerve cords (Fig. 2E, E'). However, the neural anatomy of tentacles and tentillae deserves further detailed investigations to reconcile our observations with Hernandez-Nicaise ('73b, '91)'s description of a "thick ganglion-like strand of large nerve cells" in the tentacle axis, in addition to more peripheral neural components.

Contrasting with the situation observed in ctenophores, the nervous system of cnidarians is fundamentally epithelial (ectodermal and endodermal), as are also their muscle cells (Harrison and Westfall, '91). A strictly mesogleal nerve net is generally absent in cnidarian polyps or medusae,

except in colonial octocorals (Pavans de Ceccatty and Buisson, '64; Titschack, '68, '70; Pernet et al., 2004), and the muscle cell bodies are likewise integrated within epithelia. Therefore, ctenophores and cnidarians differ fundamentally in terms of the development of the intermediate (mesogleal) compartment (Hernandez-Nicaise, '73b).

While the *Pleurobrachia* mesogleal nerve net shows a loose arrangement of neural cells, reminiscent of the organisation of cnidarian nerve nets, the polygonal nerve net has a sharply different structure. The interconnecting segments of the polygonal network do not consist of single neurites, but instead they appear as relatively thick strands containing several parallel neurites, so this “nerve net” is a plexus of anastomosed nerve cords and not of single neurons. Within this plexus, nerve cell bodies do not preferentially localise at nodes. Therefore, the intrinsic structure of the ctenophore “polygonal nerve net” reflects a degree of nervous tissue organisation not far from certain bilaterian nervous systems (e.g. the Nemertodermatida, Raikova et al., 2000; the Acoela, Raikova et al., '98, Reuter et al., 2001). In comparison, cnidarian nerve nets outside from local specialisation (e.g. oral region of polyps, peripheral region of hydromedusae) are plexus of single neurons, and thereby they have a lower degree of intrinsic condensation. It is unclear whether or not neural concentrations were present in the common ancestor of eumetazoans, but in any case the nervous system was probably affected by multiple independent events of condensation in cnidarians, ctenophores and bilaterians.

A last remarkable property revealed by our immunofluorescence analyses is the existence within the epithelial nerve net of several categories of neurons differing by their immunoreactivity. Thus, a minority of the anti-tyrosylated  $\alpha$ -tubulin immunoreactive neurons that form the polygonal network were immunoreactive for vasopressin or FMRFamide as well (Fig. 4). Due to technical limitations, we could not assess whether or not some of the nerve cells were immunoreactive for both anti-neuropeptide antibodies at the same time. On a global scale, however, current evidence suggests that

vasopressin and FMRFamide immunoreactivities characterise distinct neural cell subpopulations within the network, the former being considerably more abundant and comprising mono-ciliated neurons whereas FMRFamide immunoreactive cells are very few and lack a cilium. The existence among the nerve net of nerve cells with different biochemical properties is consistent with earlier suggestions based on cytological analyses of cytoplasmic and synaptic vesicles in ctenophores (Hernandez-Nicaise, '74). Similarly, immunodetection studies of neurotransmitter molecules (particularly neuropeptides) in cnidarians have revealed considerable diversity and specialisation of neuronal types within the cnidarian nerve nets (Grimmelikhuijzen et al., '89a, 2002; Koizumi et al., '90, 2004; Kass-Simon & Pierobon 2007).

These results furthermore suggest that the ctenophore nervous system may be partially peptidergic, which would represent a shared feature with cnidarians, but this will require confirmation by additional experimental evidence, since the antigens recognised by the anti-vasopressin and anti-FMRFamide antibodies used in this study have not been identified biochemically or genetically. Furthermore, anti-FMRFamide antibodies are capable of targeting a vast array of FMRFamide-like peptides (FLPs) in addition to FMRFamide itself. This explains in particular why a vast proportion of the cnidarian nervous system is FMRFamide immunoreactive (Grimmelikhuijzen '83; our own observations in *Clytia hemisphaerica* with the commercial anti-FMRFamide antibody used in this study) while the neuropeptide FMRFamide itself has never been isolated from any cnidarian species and is known only from molluscs and annelids (Grimmelikhuijzen 2002, Walker et al. 2010).

#### **Unexpected anatomical complexity revealed by immunofluorescent analyses of the aboral sensory complex**

Our immunohistochemical investigation of the apical organ (Fig. 5-6) and the polar fields (Fig. 7) highlights the complexity of these structures and provides a renewed view of their organisation.

Concerning the apical organ, anti-  $\alpha$ -tubulin tyrosylated-tubulin (YL1/2) and anti-FMRFamide staining revealed a conspicuous nerve net lying in continuity with the polygonal nerve net of the surrounding epithelium (Fig. 5). This AO nerve net could not be observed previously by conventional techniques, although numerous efferent, afferent and symmetrical synapses were known to occur at the base of balancer cells (Hernandez-Nicaise, '68b, '74). However, the exact position (basi-epithelial or mesogleal) of the AO nerve net could not be ascertained due to technical limitation.

Several intriguing neuro-sensory structures of the AO epithelial floor were revealed by their FMRFamide or vasopressin immunoreactivity (summarised in the drawings of Fig. 6C and 6F). Some of these structures are tetraradially arranged, while others have a biradial disposition. The puzzling fact is that none of them correspond to previously-described structures of the apical organ anatomy. In the light of current evidence, we will refrain from naming these structures or proposing functional hypotheses in terms of connecting pathways or neuro-sensory integration. What is clear is that these FMRFamide and vasopressin immunoreactive structures add to an already impressive list of more or less enigmatic (putatively neuro-sensory) components described in the floor of the ctenophore apical organ (e.g. the epithelial papillae, the refringent bodies or lamellate bodies, the bridge, etc. Chun, 1880; Horridge, '64; Krisch, '73; Hernandez-Nicaise, '74; Tamm, '82, Tamm and Tamm, 2002).

The present work also provides the first detailed description of the neuro-sensory elements associated with the polar fields (Fig. 7). These ciliated areas located on each side of the AO have been poorly investigated in previous histological studies. Anti-tyrosylated- $\alpha$ -tubulin (YL1/2) immunofluorescence

revealed a special loosely organised sub-epithelial nerve net (which includes some FMRFamide immunoreactive cells) extending throughout the polar fields and sending neurites towards the circum-polar nerve cord and the apical organ. We also showed the presence of FMRFamide immunoreactive cells associated with the previously-described "Z bodies" (Jager et al., 2008), located at the boundary between the marginal and the central zones of the polar field.

The function of the polar fields remains unknown. Their proposed role as olfactory organs (Fol, 1869; Chun, 1880; Horridge, '74; Hernandez-Nicaise, '84) has not yet been confirmed by physiological studies. Polar fields have generally been considered as a simple continuation of the aboral organ floor, but this view is clearly contradicted by the presence of the Z bodies, unique (putatively sensory) structures without equivalent elsewhere in the body, notably in the AO. Given its highly organised neuro-anatomy, possible functions for the polar field might include the processing and conveying of sensory information from peripheral areas towards the apical organ; e.g., the circum-polar nerve cord is likely to be involved in communications between the aboral neuro-sensory complex and the rest of the body.

An additional new finding with potential implication regarding polar field function is the presence of a bundle of parallel fibres, extending all along the axis of the polar field (Fig. 7), revealed by YL1/2 and phalloidin staining. Their aspect in phalloidin preparations suggests they are muscle fibres, and they appear very similar to the parietal muscle fibres occurring in the integument throughout the rest of the body (Fig. 7D). The predicted effect of contraction of this tangential polar field muscles would be reduction of polar field length, generating a tension on the apical organ. It is well known that the AO is capable of withdrawal into a cavity delineated by the surrounding epithelium, following mechanical stimulation on the body surface (Horridge, '65; Hernandez-Nicaise, '74). This vertical movement is due to contraction of deep mesogleal muscle fibres. A possible function of the polar field epithelial

muscles might be to antagonise this movement, i.e. to trigger the upwards migration of the apical organ.

### **Ctenophore aboral neuro-sensory complex vs. apical organs and brains of other animal phyla**

The body plan of most eumetazoan phyla comprises a more or less complex neuro-sensory structure localised at one pole of the organism. In the larvae of some cnidarians (Fu-Shiang and Koss, 2005; Rentsch et al. 2008) and in the planktonic ciliated larvae (“primary larvae”) of lophotrochozoans and deuterostomes (Nielsen, 2005b), the neuro-sensory centre consists of a complex of ciliary tuft cells and neurons called the “apical organ”. Most adult bilaterians possess a brain, here defined as a condensation of neural tissue at the anterior pole, integrating sensory inputs, and triggering various body responses mediated by motoneurons and neuro-endocrin cells. Whether or not the ctenophore aboral neuro-sensory complex is homologous (at least to some extent or at some level), with the apical organs and/or the brains observed in other animal phyla clearly represents a pivotal issue, notably if we wish to reconstruct the characteristics of the eumetazoan ancestor.

The ctenophore aboral sensory complex (apical organ + polar fields) features at least some characteristics of a “brain”. It is a neuro-sensory condensation localised at one pole of the organism. It perceives (and probably integrates) various kinds of sensory stimuli, and exerts a control on locomotion through regulation of the beating frequency of comb rows. Thus, there is undoubtedly a certain degree of anatomical and functional centralisation of the neuro-sensory system in ctenophores. However, while a “true” brain (present in most Bilateria) is principally made of neurons, the dominant cell type in the ctenophore aboral sensory complex is represented by epithelial ciliated cells of various kinds (Hernandez-Nicaise, '91). This is even true of the apical organ itself, since the truly neural

structures revealed here by tyrosylated  $\alpha$ -tubulin, anti-FMRFamide or anti-vasopressin immunoreactivity (Fig. 5- 6) are sunk and integrated into the ciliated epithelial floor. Furthermore, physiological studies have demonstrated that the directional and motile responses to environmental stimuli triggered by the apical organ are conveyed by ciliated cells (of the balancers, ciliated grooves and polster cells), not by nerve cells (Tamm, '82; Hernandez-Nicaise, '91). Conversely, the main peripheral neural condensation, the juxtotentacular nerve cord, is not anatomically continuous with the aboral neuro-sensory condensations (this study). We therefore propose the qualificative of "ciliary brain" for the ctenophore aboral sensory complex (apical organ + polar fields). This term is intended to reflect a limited degree of analogy, but clear absence of primary homology, with the truly neural brains of bilaterian animals.

In bilaterians with planktonic ciliated larvae (e.g. trochophore larva), the adult brain in part derives from the larval apical organ (Nielsen, 2005a, b), and some morphologists have assumed homology between these larval "apical organs" of bilaterians and the homonymic structure of ctenophores (e.g. Nielsen 2001). Morphological observations and immuno-cytochemical experiments have indicated that bilaterian larval apical organs are mechano and chemosensory structures with neuroendocrine activities involved in different functions and notably in metamorphosis (Kempf et al, '97). At first sight they could be considered similar to the ctenophore apical organ, based on sensory functions, cell condensation and apical position. More specifically, localised FMRFamide and vasopressin immunoreactivities reported here in the *Pleurobrachia* apical organ are reminiscent of the distinct RF-amide and vasotocin-neurophysin expressing cells occurring in the apical organ of the annelid trochophore larva (Tessmar-Raible et al. 2007).

However, at the anatomical level the resemblance between ctenophore and bilaterian "apical organs" is only superficial, and there are fundamental differences that strongly plead in favour of convergence.

Whereas in ctenophores the AO is a permanent structure found in cydippid larvae as well as in adults, the bilaterian apical organ is a transient structure, some populations of neurons disappearing during metamorphosis while others are incorporated into the adult nervous system (e.g. Dickinson and Croll, 2003; Byrne et al., 2007). Bilaterian larval apical organs contain only a few cells (most of ciliated protostomes larvae have an apical organ comprising 4-16 cells; Nielsen, 2004, 2005a) while the ctenophore AO comprises a much higher number of cells. The general organisation of ctenophore vs. bilaterian “apical organs” fundamentally diverges in terms of their symmetry properties: bilaterality in the latter vs. a combination of tetraradial and biradial symmetry in the former (Fig. 5-6). It is also noteworthy that perception of gravity in bilaterian larvae is by sensory organs (statocysts) spatially separated from the apical organ (e.g. in gastropod trochophores; Kempf et al. '97), whereas in ctenophores the apical organ by itself is a statocyst (notwithstanding its additional functions). Homology at the anatomical level is therefore unlikely. Similarly, the aboral condensation of monociliated sensory neurons sometimes called “apical organ” in some cnidarian planula larvae comprises few cell types, does not show any particular symmetry in its organisation, and does not function as a statocyst, and therefore is certainly not homologous to the ctenophore apical organ (Chia and Koss, '79, Nakanishi et al. 2008, Marlow et al. 2009).

In spite of the absence of homology at the anatomical level, the shared existence of distinct RF-amide and vasopressin/vasotocin immunoreactive cells in ctenophore AO (this study) and in the apical organ of bilaterian larvae (Tessmar-Raible et al. 2007) might reflect homology at the level of particular types of sensory-neurosecretory cells, among distantly-related eumetazoans, as previously suggested among distant bilaterians (Tessmar-Raible et al. 2007).

## Conclusion

Coelenterate nervous systems share important common characteristics, such as a nerve net that extends over the whole organism and the presence of neuropeptides, but the ctenophore nervous system clearly departs from the cnidarian nervous system by several significant features including the condensed architecture of their polygonal nerve net (plexus of nerve cords), the presence of a truly mesogleal (i.e. mesodermal) nerve net, and their unique aboral neuro-sensory complex. These characters evoke body plan attributes that were classically considered typical for the Bilateria. Future comparative work on developmental genes might indicate if these characters have evolved independently in the ctenophore lineage, or are ancestral features of the eumetazoan ancestor that have been lost in cnidarians. Further information is also expected to come from studies using a wider range of antibodies directed against putative neurotransmitters, as well as from investigation of other ctenophore species using the same approaches.

#### 4. Acknowledgements

Specimen collection and manipulations were done at the Station Zoologique in Villefranche-sur-Mer. We thank Evelyn Houliston for providing lab facilities. We are grateful to the sailors of the Villefranche zoological station, to Marie Cariou for technical help and to Lucas Leclère for discussion. We are particularly grateful to Mari-Luz Hernandez-Nicaise for stimulating discussions and insightful advice about ctenophore anatomy. This work was supported by a grant from the GIS “Institut de la Génomique Marine” – ANR “programme blanc” NT\_NV\_52 Genocnidaire and the “Agence Nationale de la Recherche” grant ANR-09-BLAN-0236 DiploDevo.

## 5. Literature Cited

- Bardou I, Maubert E, Leprince J, Chichery R, Cocquerelle C, Launay S, Vivien D, Vaudry H, Agin V. 2009. Distributions of Oxytocin-like and Vasopressin-like immunoreactivities within the central nervous system of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Cell Tissue Res* 336: 249-266.
- Bethe A. 1895. Der subepitheliale Nervenplexus der Ctenophoren. *Biol Zbl* 15:140-145.
- Brown A., Li Y., Slaughter T. and Black M. 1993. Composite microtubules of the axon : quantitative analysis of tyrosinated and acetylated tubulin along individual axonal microtubules. *Journal of Cell Science* 104: 339-352.
- Bullock TH., Horridge G. 1965. Structure and function in the nervous systems of invertebrates. vol. I. San Francisco: W.H. Freeman.
- Byrne M, Nakajima Y, Chee FC, Burke RD. 2007. Apical organs in echinoderm larvae: insights into larval evolution in the Ambulacraria. *Evol Dev* 9:432-445.
- Caldwell HK, Lee H-J, Macbeth AH, Scott Young III W. 2008. Vasopressin: Behavioral roles of an “original” neuropeptide. *Progress in neurobiology* 84: 1-24.
- Chia FS and Koss R. 1979. Fine-structural studies of the nervous system and the apical organ in the planula larva of the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *J. Morphol* 160: 275-298.
- Chun C. 1880. Die Ctenophoren des Golfes von Neapel und der angrenzenden Meeres-Abschnitte: eine Monographie. Leipzig: Verlag von W. Engelmann.
- Delage Y, Hérouard E. 1901. *Traité de zoologie concrète*. Librairie C. Reinwald. Paris.
- Dickinson AJG, Croll RP. 2003. Development of the larval nervous system of the gastropod *Ilyanassa obsoleta*. *J. Comp. Neurol* 466:197-218.
- Dunn CW, Hejnol A, Matus DQ, Pang K, Browne WE, Smith SA, Seaver E, Rouse GW, Obst M, Edgecombe GD, Sørensen MV, Haddock SH, Schmidt-Rhaesa A, Okusu A, Kristensen RM, Wheeler WC, Martindale MQ, Giribet G. 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452:745-749.

Eimer T. 1880. Versuche über künstliche Teilbarkeit von *Beroe ovata*. Arch. f. mikr. Anat. 17:213.

Fol H. 1869. Ein Beitrag zur Anatomie und Entwicklungsgeschichte einiger Rippenquallen: Inaugural-Dissertation.

Franc JM. 1985. La mésoglée des cténaires: Approches ultrastructurale, biochimique et métabolique. Université Claude Bernard - Lyon I.

Fu-Shiang C, Koss R. 2005. Fine structural studies of the nervous system and the apical organ in the planula larva of the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. J Morphol 160: 275-297.

Galliot B, Quiquand M, Ghila L, de Rosa R, Miljkovic-Licina M, Chera S. 2009. Origins of neurogenesis, a cnidarian view. Dev Biol 332:2-24.

Grimmelikhuijzen CJP, Dierick K and Boer GJ. 1982. Oxytocin/vasopressin-like immunoreactivity is present in the nervous system of *Hydra*. Neuroscience 7:3191-3199.

Grimmelikhuijzen CJP. 1983. FMRFamide immunoreactivity is generally occurring in the nervous systems of coelenterates. Histochem 78:361-381.

Grimmelikhuijzen CJP, Spencer AN. 1984. FMRFamide immunoreactivity in the nervous system of the medusa *Polyorchis penicillatus*. J. Comp. Neurol. 230: 361-371.

Grimmelikhuijzen CJP, Graff D, McFarlane ID. 1989a. Neurones and neuropeptides in coelenterates. Arch Histol Cytol 52 Suppl:265-78.

Grimmelikhuijzen CJP, Graff D, Spencer AN. 1989b. Structure, location and possible actions of Arg-Phe-amide peptides in coelenterates. In: Neurohormones in Invertebrates. Cambridge University Press. Cambridge: MC Thorndyke and GJ GoldWorthy. p 199-127.

Grimmelikhuijzen CJ, Leviev I, Carstensen K. 1996. Peptides in the nervous systems of cnidarians: structure, function, and biosynthesis. Int Rev Cytol 167:37-89.

Grimmelikhuijzen CJP, Williamson M, Hansen GN. 2002. Neuropeptides in cnidarians. Can J Zool 80:1690–1702.

Hammond JW, Cai D, Verhey KJ. 2008. Tubulin modifications and their cellular functions. Curr Opin Cell Biol 20:71-76.

- Harrison FW, Westfall JA. 1991. Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora. New York: Wiley-Liss.
- Heider K. 1927. Über das Nervensystem von *Beroe ovata*. Nachrichten der Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen, Math.-phys. Kl. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht.
- Hernandez-Nicaise ML. 1968a. Specialized connexions between nerve cells and mesenchymal cells in ctenophores. *Nature* 217:1075-6.
- Hernandez-Nicaise ML. 1968b. Distribution and ultrastructure of symmetrical synapses in the Ctenaire nervous system. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 267:1731-4.
- Hernandez-Nicaise ML. 1973a. The nervous system of ctenophores. I. Structure and ultrastructure of the epithelial nerve-nets. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 137:223-50.
- Hernandez-Nicaise ML. 1973b. The nervous system of ctenophores. II. The nervous elements of the mesoglea of beroids and cydippids (author's transl). *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 143:117-33.
- Hernandez-Nicaise ML. 1973c. The nervous system of ctenophores. III. Ultrastructure of synapses. *J Neurocytol* 2:249-63.
- Hernandez-Nicaise ML. 1974. Système nerveux et intégration chez les cténaires; étude ultrastructurale et comportementale. Univ. Claude Bernard, Lyon, France.
- Hernandez-Nicaise ML. 1984. Ctenophora. Dans: *Biology of the integument*. Vol. Volume 1 Invertebrates. Springer-Verlag. Berlin: J. Bereiter-Hahn, A.G. Matoltsy and K.S. Richards. p 96-111.
- Hernandez-Nicaise ML. 1991. Ctenophora. Dans: *Microscopic Anatomy of the Invertebrates*. Vol. Volume II: Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora. John Wiley. New York: F.W. Harrison and J.A. Westfall. p 359-418.
- Hertwig R. 1880. Ueber den Bau der Ctenophoren. G. Fischer.
- Horridge GA. 1965. Relations between nerves and cilia in Ctenophores. *Am Zool* 5:357-75.
- Horridge GA. 1964. Presumed Photoreceptive Cilia in a Ctenophore. *Journal of Cell Science* 3:311.
- Horridge GA. 1974. Recent studies on the Ctenophora. Dans: *Coelenterate biology: reviews and new perspectives*. Leonard Muscatine and Howard M. Lenhoff. p 439-68.
- Horridge GA, Mackay B. 1962. Naked Axons and Symmetrical Synapses in Coelenterates. *J Cell Sci* 3:531.

- Horridge GA, Mackay B. 1964. Neurociliary Synapses in Pleurobrachia (Ctenophora). *J Cell Sci* 3:163.
- Hyman L. 1940. The Invertebrates: Protozoa Through Ctenophora. McGraw-Hill. New York.
- Jager M, Quéinnec E, Chiori R, Le Guyader H, Manuel M. 2008. Insights into the early evolution of SOX genes from expression analyses in a ctenophore. *J Exp Zoolog B Mol Dev Evol* 310B:650-667.
- Kass-Simon G, Pierobon P. 2007. Cnidarian chemical neurotransmission, an updated overview. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol* 146:9-25.
- Kempf SC, Page LR, Pires A. 1997. Development of Serotonin-like immunoreactivity in the embryos and larvae of nudibranch molluscs with emphasis on the structure and possible function of the apical sensory organ. *J Comp Neurol* 386: 507-528.
- Koizumi O, Mizumoto H, Sugiyama T, Bode HR. 1990. Nerve net formation in the primitive nervous system of Hydra--an overview. *Neurosci. Res. Suppl* 13:S165-170.
- Krisch B. 1973. Über das Apikalorgan (Statocyste) der Ctenophore Pleurobrachia pileus. *Cell Tissue Res* 142:241-262.
- Marlow HQ, Srivastava M, Matus DQ, Rokhsar D, Martindale MQ. 2009. Anatomy and development of the nervous system of Nematostella vectensis, an anthozoan cnidarian. *Dev Neurobiol* 69:235-254.
- Martindale MQ, Henry JQ. 1997. Reassessing embryogenesis in the Ctenophora: the inductive role of e1 micromeres in organizing ctene row formation in the 'mosaic' embryo, *Mnemiopsis leidyi*. *Development* 124:1999-2006.
- Martindale MQ, Henry JQ. 1999. Intracellular fate mapping in a basal metazoan, the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*, reveals the origins of mesoderm and the existence of indeterminate cell lineages. *Dev Biol* 214:243-57.
- Miller G. 2009. Origins. On the origin of the nervous system. *Science* 325:24-26.
- Nakanishi N, Yuan D, Jacobs DK, Hartenstein V. 2008. Early development, pattern, and reorganization of the planula nervous system in *Aurelia* (Cnidaria, Scyphozoa). *Dev. Genes Evol* 218:511-524.
- Nielsen C. 2001. Animal evolution: interrelationships of the living phyla. 2nd edition. Oxford: Oxford University Press.

Nielsen C. 2004. Trochophora larvae: cell-lineages, ciliary bands and body regions. 1. Annelida and Mollusca. *J Exp Zool* 302B: 35-68.

Nielsen C. 2005a. Trochophora larvae: cell-lineages, ciliary bands and body regions. 1. Annelida and Mollusca. *J Exp Zool* 304B: 401-447.

Nielsen C. 2005b. Larval and adult brains. *Evol Dev* 7: 483-489.

Pavans de Ceccatty, Buisson B. 1964. Le système nerveux intramésoglen dans les colonies de *Veretillum cynomorium* Pall. (Cnidaire, Pennatulidae). *C R Acad Sci Paris* 259:3611-3613.

Pernet V, Anctil M, Grimmelikhuijen CJP. 2004. Antho-RFamide-containing neurons in the primitive nervous system of the anthozoan *Renilla koellikeri*. *J Comp Neurol* 472:208-220.

Philippe H, Derelle R, Lopez P, Pick K, Borchiellini C, Boury-Esnault N, Vacelet J, Renard E, Houliston E, Quéinnec E, Da Silva C, Wincker P, Le Guyader H, Leys S, Jackson DJ, Schreiber F, Erpenbeck D, Morgenstern B, Wörheide G, Manuel M. 2009. Phylogenomics Revives Traditional Views on Deep Animal Relationships. *Curr Biol* 10:106-113.

Raikova OI, Reuter M, Kotikova EA, Gustafsson MKS. 1998. A commissural brain! The pattern of 5-HT immunoreactivity in Acoela (Plathelminthes). *Zoomorphology* 118:69-77.

Raikova OI, Reuter M, Jondelius U, Gustafsson MK. 2000. The brain of the Nemertodermatida (Platyhelminthes) as revealed by anti-5HT and anti-FMRFamide immunostainings. *Tissue Cell* 32:358-365.

Rentsch F, Fritzenwanker JH, Scholz CB, Technau U. 2008. FGF signalling controls formation of the apical sensory organ in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Development* 135: 1761-1769.

Reuter M, Raikova OI, Jondelius U, Gustafsson MK, Maule AG, Halton DW. 2001. Organisation of the nervous system in the Acoela: an immunocytochemical study. *Tissue and Cell* 33:119-128.

Samassa P. 1892. Zur Histologie der Ctenophoren. *Arch mikr Anat* 40:157-242.

Schierwater B, Eitel M, Jakob W, Osigus H, Hadrys H, Dellaporta SL, Kolokotronis S, Desalle R. 2009. Concatenated analysis sheds light on early metazoan evolution and fuels a modern "urmetazoon" hypothesis. *PLoS Biol* 7:e20.

Tamm S, Tamm SL. 1995. A giant nerve net with multi-effector synapses underlying epithelial adhesive strips in

the mouth of Beroë (Ctenophora). *J Neurocytol* 24:711-23.

Tamm SL. 1982. Ctenophora. Dans: Electrical Conduction and Behaviour in 'simple' Invertebrates. Oxford University Press. Oxford: GAB. Shelton. p 266-358.

Tamm SL, Tamm S. 2002. Novel bridge of axon-like processes of epithelial cells in the aboral sense organ of ctenophores. *J Morphol* 254:99-120.

Tessmar-Raible K, Raible F, Christodoulou F, Guy K, Rembold M, Hausen H and Arendt D. 2007. Conserved sensory-neurosecretory cell types in annelid and fish forebrain: insights into hypothalamus evolution. *Cell*. 129(7):1389-400.

Titschack H. 1968. Über das Nervensystem der Seefeder *Veretillum cynomorium* (Pallas). *Cell Tissue Res* 90:347-371.

Titschack H. 1970. Über das mesogloale Nervensystem der Oktocoral- len *Alcyonium palmatum* Pallas und *Eunicella stricta* (Bertoloni). *Zool Anzeiger* 185:68-75.

Walker RJ, Papaioannou S, Holden-Dye L. 2010. A review of FMRFamide- and Rfamide-like peptides in metazoa. *Invert Neurosci DOI* 10.1007/s10158-010-0097-7.

Watanabe H, Fujisawa T, Holstein TW. 2009. Cnidarians and the evolutionary origin of the nervous system. *Dev. Growth Differ* 51:167-183.

## 6. Figure legends

**Fig. 1:** **A.** General organisation of *Pleurobrachia pileus* (from Jager et al., 2008). **B.** Diagram summarising the relative positions with respect to the basal lamina (in blue) of the polygonal (epithelial) nerve net and of the mesogleal nerve net, based on previous TEM investigations (references cited in the text) and on results from the present study. Also included in the diagram are mesogleal and epithelial muscle cells and, at the bottom left corner, epithelial cells and both types of sensory cells (vibroreceptors and hoplocytes). Other cell types (e.g. gland cells) have been omitted for clarity. Note that the existence on the diagram of a space between the mesogleal nerve net and the basal lamina is intended to reflect uncertainty about a possible connection between the two nerve nets.

**Fig. 2.** Characterisation of *Pleurobrachia*'s nerve nets by anti-tyrosylated- $\alpha$ -tubulin (YL1/2) immunostaining (in red) and DAPI counterstaining (in blue): **A.** General view of the polygonal nerve net showing its general organisation. White arrowheads indicate where neurites of isolated neurons (N, Nc) join the main network. **A'.** Higher magnification view showing that several parallel neurites are associated to form each segment of the network (white arrowheads). **B.** Distribution of neural cell bodies (Ncb) in a closer view of the polygonal nerve net. **B'.** Higher magnification view of an isolated ciliated neuron (white arrow: cilium) and its connection to the main network (white arrowhead; stars: nuclei of neural cells belonging to the polygonal nerve net). **C.** A portion of the mesogleal nerve net (white arrows: nerve cell bodies; white arrowheads: nuclei of muscle cells). **D.** Contact (white arrowheads) between a neurite of a mesogleal nerve cell and a mesogleal muscle fibre (Mmf). **E.** The tentacle contains two parallel nerve cords stained with YL1/2 (white arrows) and linked by transverse connections (white arrowhead). **E'.** Confocal longitudinal view of the tentacle counterstained with phalloidin (in green), showing that the two nerve cords (arrows) are embedded into the muscle layer and thereby belong to the mesoglea (Ecto: ectoderm; Meso: mesoglea). **F.** A mesenchymal cell of the “vacuolated cell” type (stained by both YL1/2 and phalloidin), and a mesogleal nerve cell (only

stained by YL1/2) in the same optical plan. **G-I**. The three types of mesenchyme cells **G**. Vacuolated cell. **H**. Clear cell. **I**. Filamentous cell. C and E': confocal microscopy (Z projection 14.7  $\mu\text{m}$  in C, 20.44  $\mu\text{m}$  in D); other pictures: classical microscopy. Col: colloblasts; Gc: glandular cell; Mmf: mesogleal muscle fibre; N: isolated nerve cell; Nc: isolated ciliated nerve cell; Ncb: nerve cell body; Pmf: parietal muscle fibre ; Sc : sensory cell. Scale bars: A, B, E: 20  $\mu\text{m}$  ; C, E': 10  $\mu\text{m}$  ; A' B',D, F-I: 5  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 3.** Modifications of the polygonal nerve net visualised by anti-tyrosylated- $\alpha$ -tubulin (YL1/2) immunostaining. **A**. General view of the polygonal nerve net at the aboral pole showing the juxtapotentacular nerve cords (white arrows) and a higher polygon density near the apical organ. **B**. Juxtapotentacular nerve cord (white arrows) entering into a tentacle sheath. **C**. Closer view of the juxtapotentacular nerve cord stained by YL1/2 (in red) and with Dapi counterstaining (in blue) showing its integration within the polygonal nerve net. White arrowheads indicate groups of nerve cell bodies of the juxtapotentacular nerve cord. **D**. The nerve net at the vicinity of the apical organ showing how the juxtapotentacular nerve cord vanishes into the nerve net. **E**. Extremity of a polar field and surrounding polygonal nerve net, showing the external circum-polar nerve cord (Enc) and the preferential orientation of the nerve net meshes around the polar field. **E'**. Higher magnification view of the boxed area in E. **F** and **G** (higher magnification). Morphology of the nervous system along a ciliated groove (arrows: thin nerve cords running along the edges of the ciliated groove; arrowheads: transverse neurites joining both nerve cords). **H**. Higher density and preferential orientation of the meshes (arrows) between three successive comb plates. **I**. Higher density and preferential orientation of the meshes (arrows) around the mouth. AO: apical organ; Cg: ciliated groove; Cp: comb plate; Enc: external circum-polar nerve cord; Gc: glandular cell; Nc: isolated ciliated nerve cell; Pf: polar field; T: tentacle; Ts: tentacle sheath. Scales bars: A, B, E, H, I: 50  $\mu\text{m}$ ; D', E, F, G: 20  $\mu\text{m}$ ; C: 5  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 4.** Distinct nerve cells subpopulations revealed in the epithelium by antibodies directed against neuropeptides (in green with anti-tyrosylated- $\alpha$ -tubulin (YL1/2) counterstaining in red and Dapi in blue). **A.** Anti-FMRFamide (FM) positive cells near a ciliated groove. **A'**. Higher magnification view corresponding to box 1 in A, showing a FMRFamide positive nerve cell integrated into the polygonal nerve net and counterstained by YL1/2 (yellow staining: white arrowheads). **A''**. Higher magnification view corresponding to box 2 in A, showing an isolated FMRFamide positive nerve cell not counterstained by YL1/2 (green staining: white arrowheads). **B.** Distribution of anti-vasopressin immunoreactive neurons (green) throughout the polygonal nerve net. **B'**. Higher magnification view of an anti-vasopressin positive cell with distribution of staining throughout neurites (white arrowheads) and cell body, the latter bearing a cilium (Vc). Cg: ciliated groove; Pmf: parietal muscle fibre; Vc: cilium. Scales bars: A, B: 20  $\mu$ m; A', A'', B': 5  $\mu$ m.

**Fig. 5.** Organisation of the apical organ and associated neural structures. All pictures are aboral views with the same orientation (Tp: tentacular plane; Pp: pharyngeal plane). The dotted circle delineates the border of the apical organ. **A.** DIC view of the apical organ showing the four balancers (B) and four groups of large refringent round cells called "refringent bodies" (Rb). A pair of ciliated grooves near a balancer is indicated by arrowheads. **B-B'**. DAPI staining views showing the distribution of nuclei in the epithelial floor of the apical organ in two different optical planes: basi-epithelial (deep) plane on the left (B) and superficial plane on the right (B'). **C.** The deep nerve net of the apical organ floor revealed by YL1/2 staining. Note its continuity with the surrounding polygonal nerve net (arrowheads) and the polar field nervous system (arrow). **C'**. Higher magnification view of the boxed area in C showing a nerve cell. **D.** The deep nerve net of the apical organ floor is also positive with the anti-FMRFamide antibody. See Fig. 6 for description of the four additional strongly stained structures (black stars). The 4 spots located on the border of the apical organ (white arrowheads) are not specific as they were also stained using the secondary antibody only. **D'**. Composite view of YL1/2 (in red) and anti-FMRFamide (in green) staining in the area boxed in D. B: balancer; Ep: epithelial papillae;

Lt: lithocytes; Mz: marginal zone of a polar field; Rb: refringent body; Tp: Tentacular plane; Pp: pharyngeal plane. Scales bars: A-C, D: 20  $\mu\text{m}$ ; C': 5  $\mu\text{m}$ ; D': 10 $\mu\text{m}$ .

**Fig. 6.** Anti-neuropeptide immunoreactive neural condensations in the apical organ. The dotted circle delineates the border of the apical organ. **A-C.** Structures revealed by anti-FMRFamide staining (green) (DAPI counter-staining in blue). **A.** Deep aboral view of the AO showing four intensely stained structures near the balancers (white stars) and four lines (white arrows) running from the refringent bodies (Rb) towards the periphery of the apical organ. The apical organ nerve net is also visible (double arrowheads). **B.** Profile view of the apical organ (labels as in A). **B'.** Higher magnification of one of the four strongly stained anti-FMRFamide positive structures. **C.** Diagrams of the anti-FMRFamide staining (in green) in the apical organ. Note that the right diagram is not a section but a projection in profile view. **D-F.** Structures revealed by anti-vasopressin staining (green) in the apical organ. **D.** Aboral view showing central stained structures (white and black stars) near the balancers as well as peripheral V-shaped structures near the epithelial papillae (Ep) (arrowheads; note that epithelial papillae are not visible on the right side). **E.** Profile view of the anti-vasopressin immunostaining in the apical organ (labels as in D). Note that this picture is from another specimen than the picture in D, and in this case a superficial line (white arrows) appears to join the two structures labelled with black stars. **F.** Diagrams of the anti-vasopressin staining in the apical organ. Note that the right diagram is not a section but a projection in profile view. D: confocal microscopy (Z projection 5.54  $\mu\text{m}$ ); other pictures: classical microscopy. B: balancers; Ep: epithelial papillae, Rb: refringent bodies. Scale bars: A, B, D, E: 20  $\mu\text{m}$  ; B': 10 $\mu\text{m}$ .

**Fig. 7.** The nervous system associated with the polar fields. **A-C.** Three distinct regions of a polar field stained by anti-tirosylated- $\alpha$ tubulin (YL1/2) and showing the iterated Z bodies (stars) along the inner margin of the marginal zone and parallel muscle fibres (Pfm) beneath the central ciliated epidermis. **A.**

Proximal polar field region showing densely packed Z bodies (brackets) and the extremity of the polar field muscular fibres. **B.** Central part of a polar field showing regularly distributed Z bodies (stars) connected by thin processes (arrowheads). **C.** Distal region of a polar field (labels as in B). **D.** Phalloidin staining allows a better visualisation of the polar field muscle (Pfm). **E.** Nerve net underlying the polar field, with a contact between a muscular fibre and a neurite (arrowhead). The more superficial Z bodies are visible but out of focus (stars). **E'.** Higher magnification of a nerve cell stained by both YL1/2 (in red) and anti-FMRFamide (in green). **F.** YL1/2 immuno-staining (in red) combined with DAPI counter-staining (in blue) reveals polar field neurites extending towards the apical organ (arrowhead). **G.** FMRFamide immunostaining (in green) in the proximal region of a polar field (with Dapi counterstaining), showing immuno-positive cells associated with the Z bodies (brackets and stars). **H.** Detailed view of FMRFamide staining (in green) in Z-bodies combined with YL1/2 staining (in red) and DAPI counter-staining (in blue). **I.** Diagram of the polar field summarising all the described structures. AO: apical organ; Enc: external circum-polar nerve cord; Mfm: mesogleal muscular fibre; Mz: marginal zone; N: polar field nerve cell; Pf: polar field; Pfm: polar field muscular fibre. Scale bars: A-C, E, F, G: 20  $\mu$ m, D: 50  $\mu$ m, H: 10  $\mu$ m; E': 5  $\mu$ m.

## Supplementary data

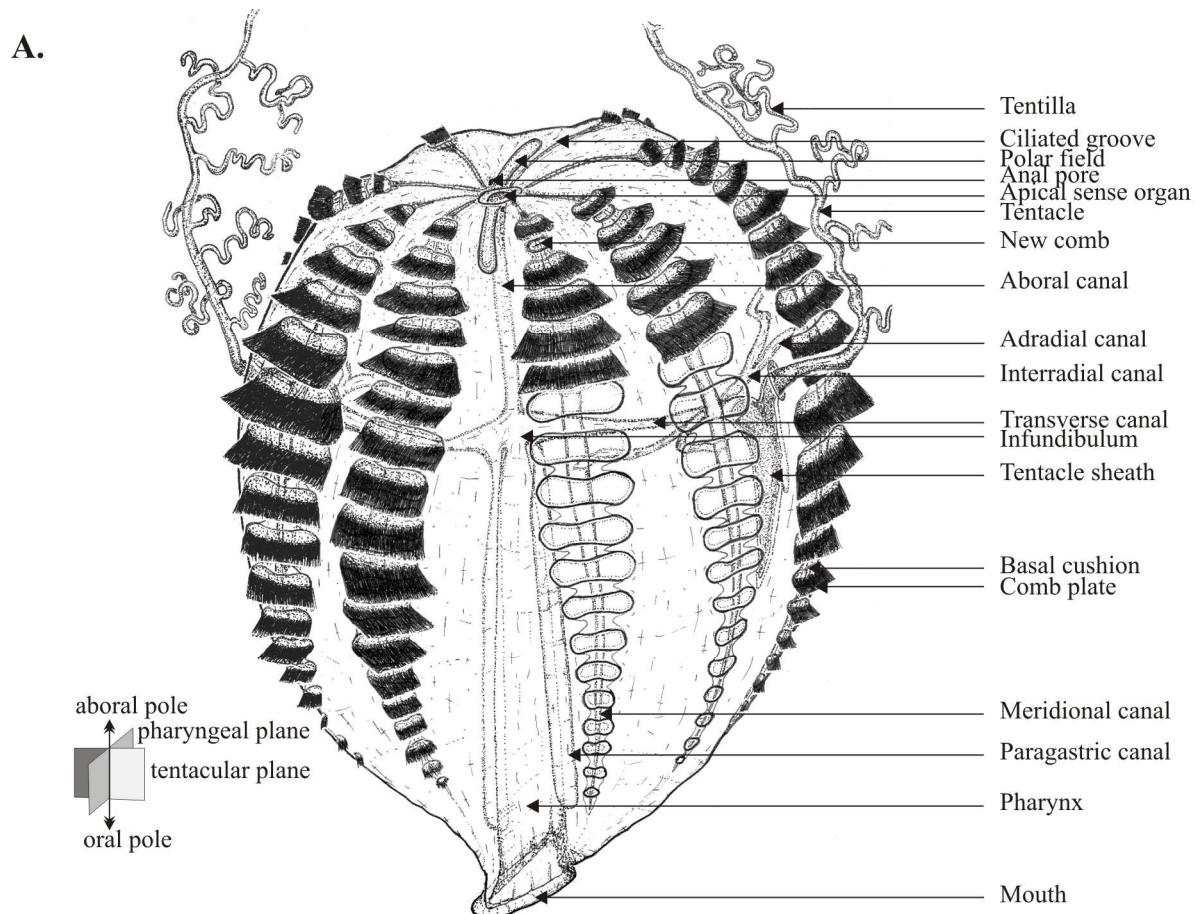
Supplementary Movie 1: *Pleurobrachia pileus* nerve nets revealed by YL1/2 antibody. Z Optical acquisition (15  $\mu\text{m}$ ) starting from the epithelial layer and extending into the mesoglea. First appears the polygonal nerve net, followed by four mesenchymal vacuolated cells, then a first mesogleal nerve cell. More deeply, a tripolar mesogleal nerve cell is visible together with a muscle fibre and a vacuolated cell (with putative connections). Finally, connection between the tripolar nerve cell and a last mesogleal nerve cell is labelled.

Supplementary Movie 2: Localisation of FMRFamide immunostaining in the apical organ (in green) with Dapi counterstaining in red. Z optical Confocal acquisition (10. 9  $\mu\text{m}$ ) from the apical surface to the floor of the apical organ. Note that the apical organ is viewed in oblique orientation (less pronounced in the superficial region). The anti-FMRFamide antibody reveals two lines of stained processes in the tentacular plane close to the apical surface of the epithelium. Then staining is detected through the refringent bodies Within the AO floor, the anti-FMRFamide signal is detected in four structures adjacent to balancer cells and spanning the entire thickness of the epithelium (Numerous cells are stained, which project thin interwoven neurites weaved between cells nuclei).

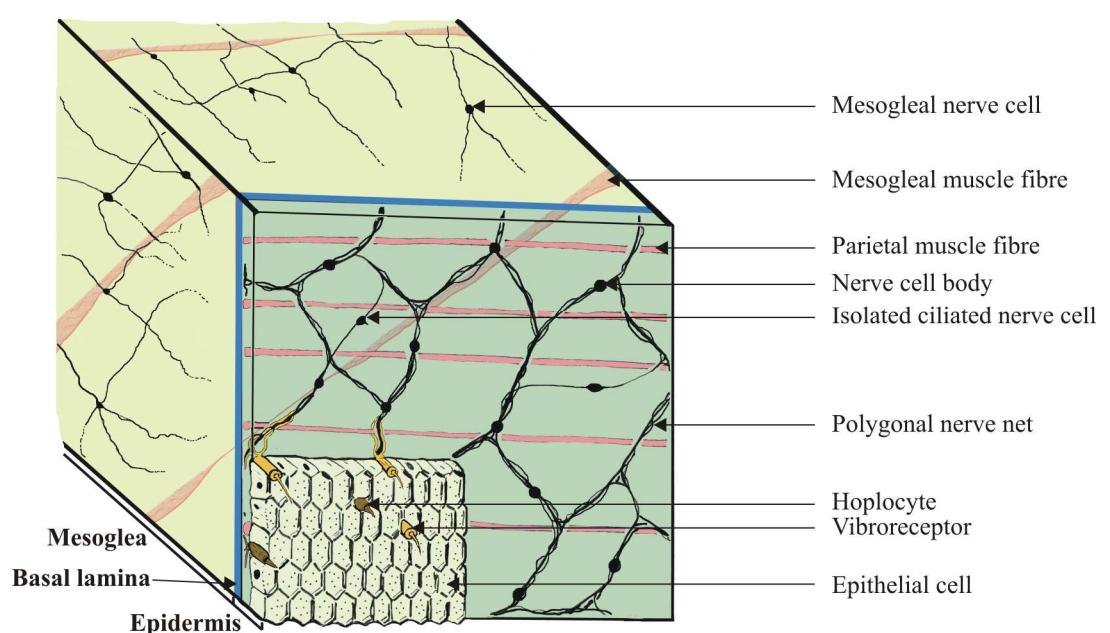
Supplementary Movie 3: Localisation of Vasopressin immunostaining in the apical organ (in green) with Dapi-counterstaining in red. Z optical Confocal acquisition (24.9  $\mu\text{m}$ ) from the apical surface to the floor of the apical organ. In the central region of the AO, two lines of Vasopressin-like immunoreactive cells are detected. They extend through the whole thickness of the apical organ floor. Four slightly more peripheral groups of stained neural cells also extend through the whole thickness of the floor. At the periphery of the AO and close to the epithelial papillae, the anti-vasopressin antibody also reveals stained cells that send processes throughout the thickness of the apical organ floor.

Supplementary Movie 4: Localisation of FMRFamide immunostaining in several Z-bodies (in green), in the proximal region of a polar field. Dapi counterstaining in red. Z optical Confocal acquisition (6.4  $\mu$ m) starting from the surface. Z bodies are composed of several cells, of which at least one is FMRF-amide positive. These positive cells bear processes pointing in opposite directions.

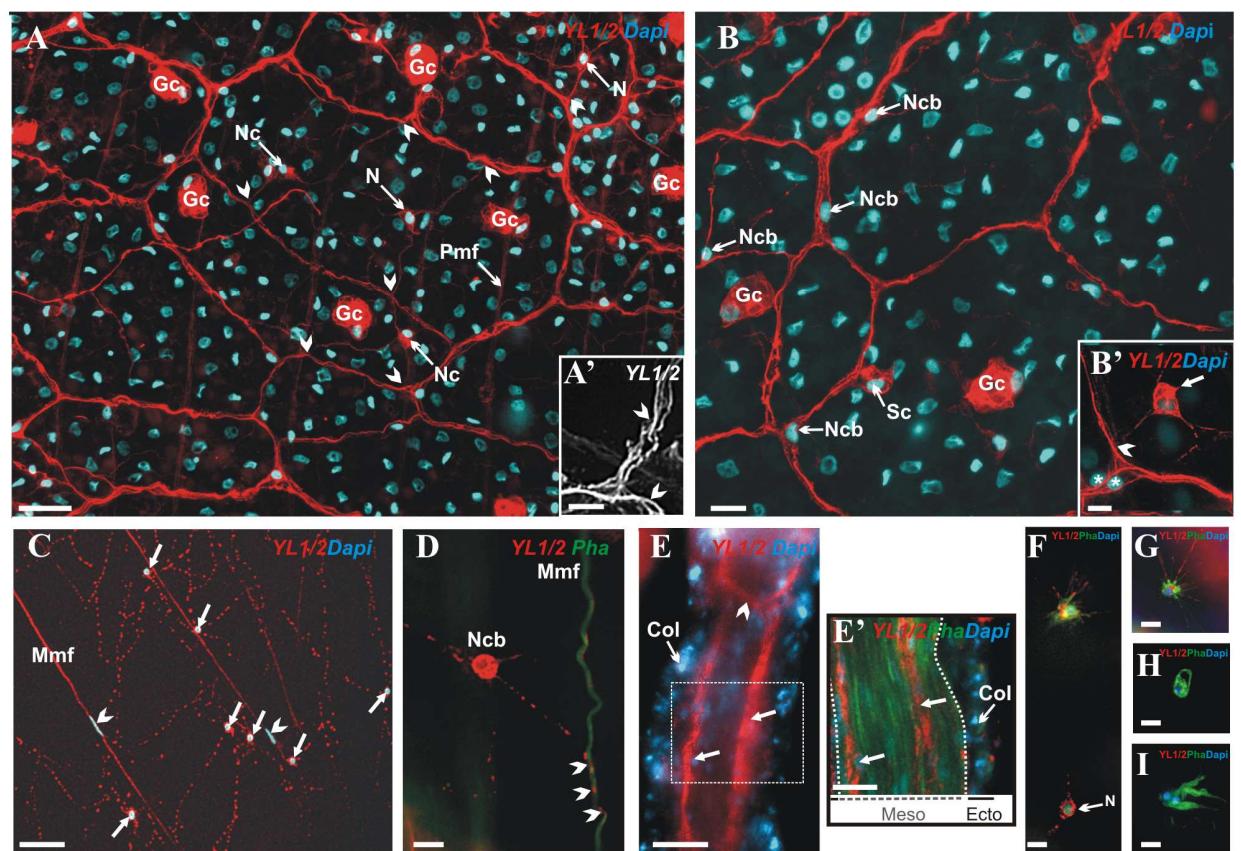
**Figure 1**



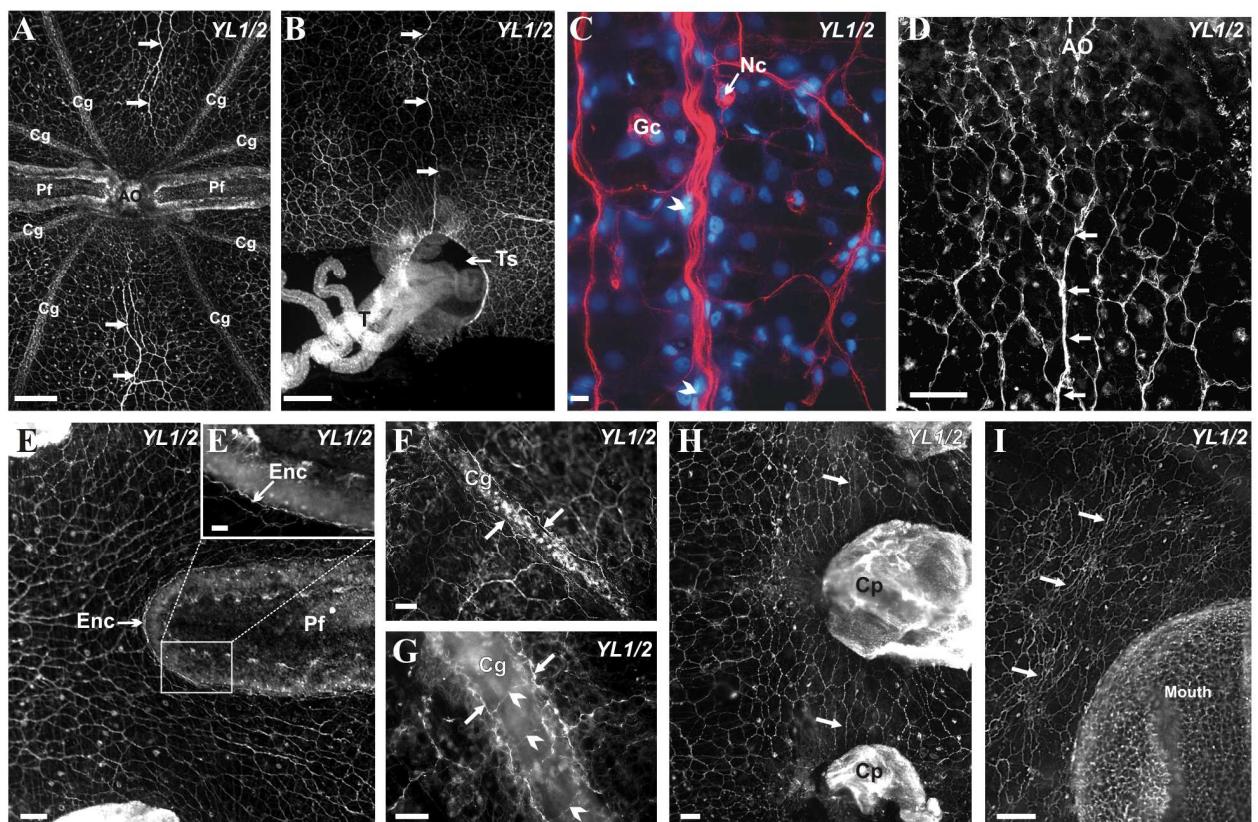
**B.**



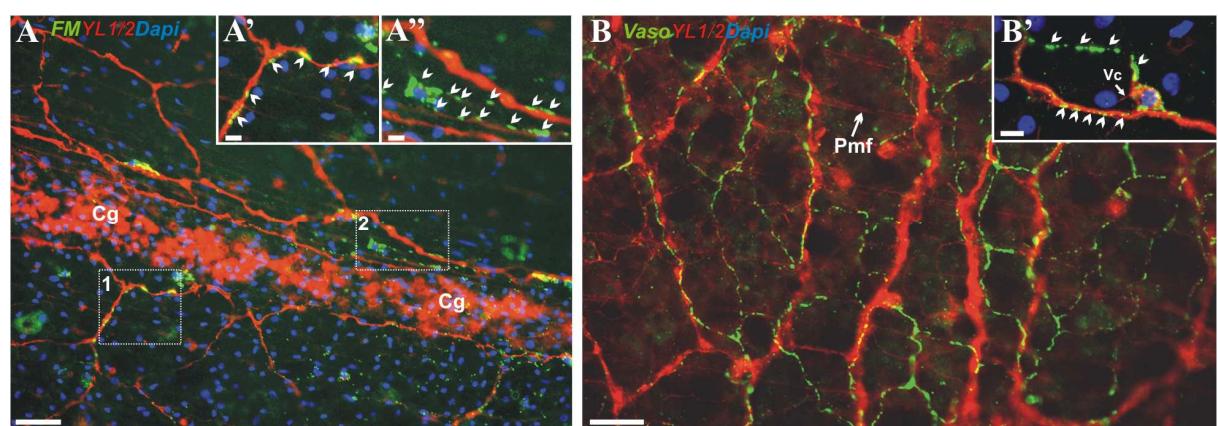
**Figure 2**



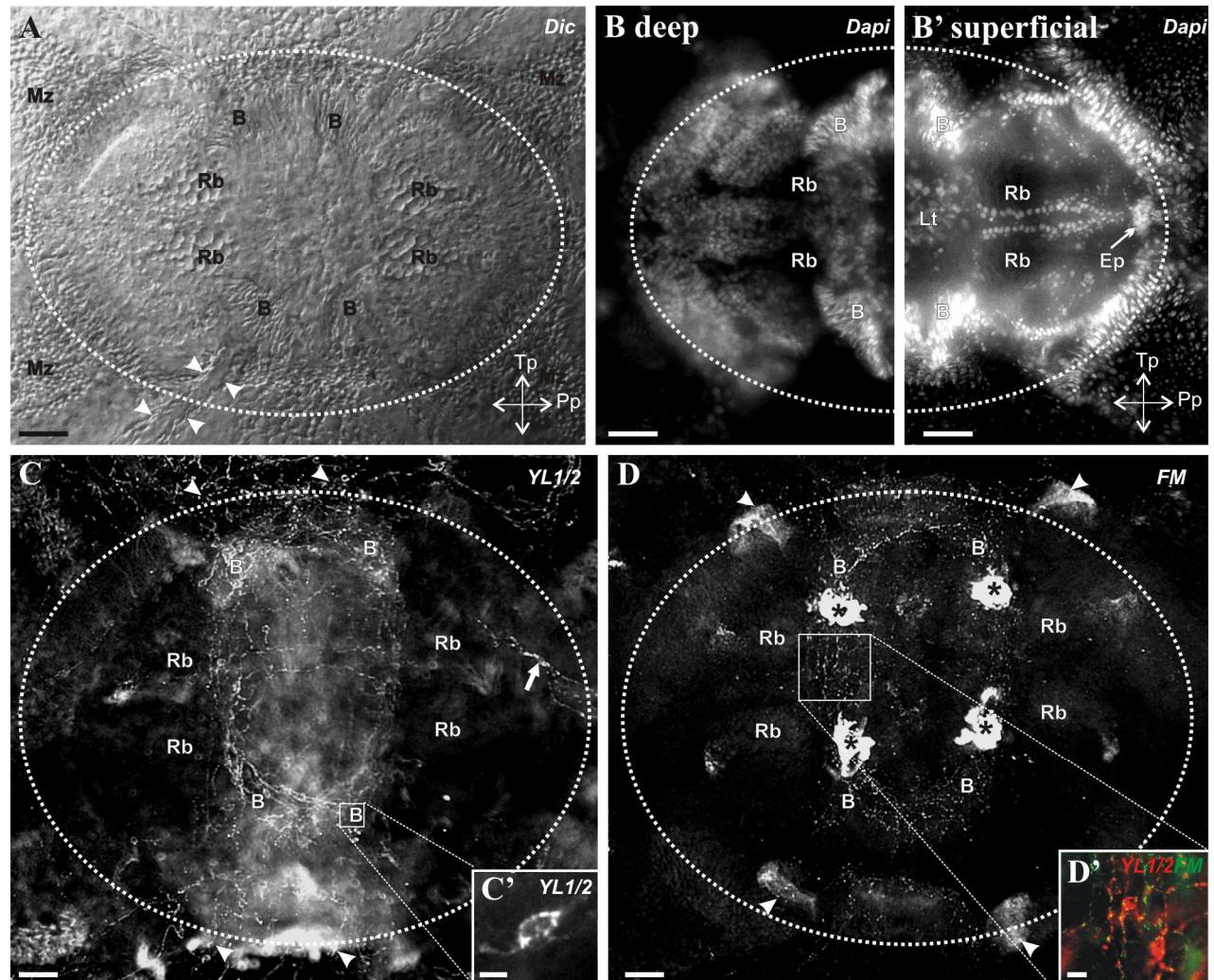
**Figure 3**



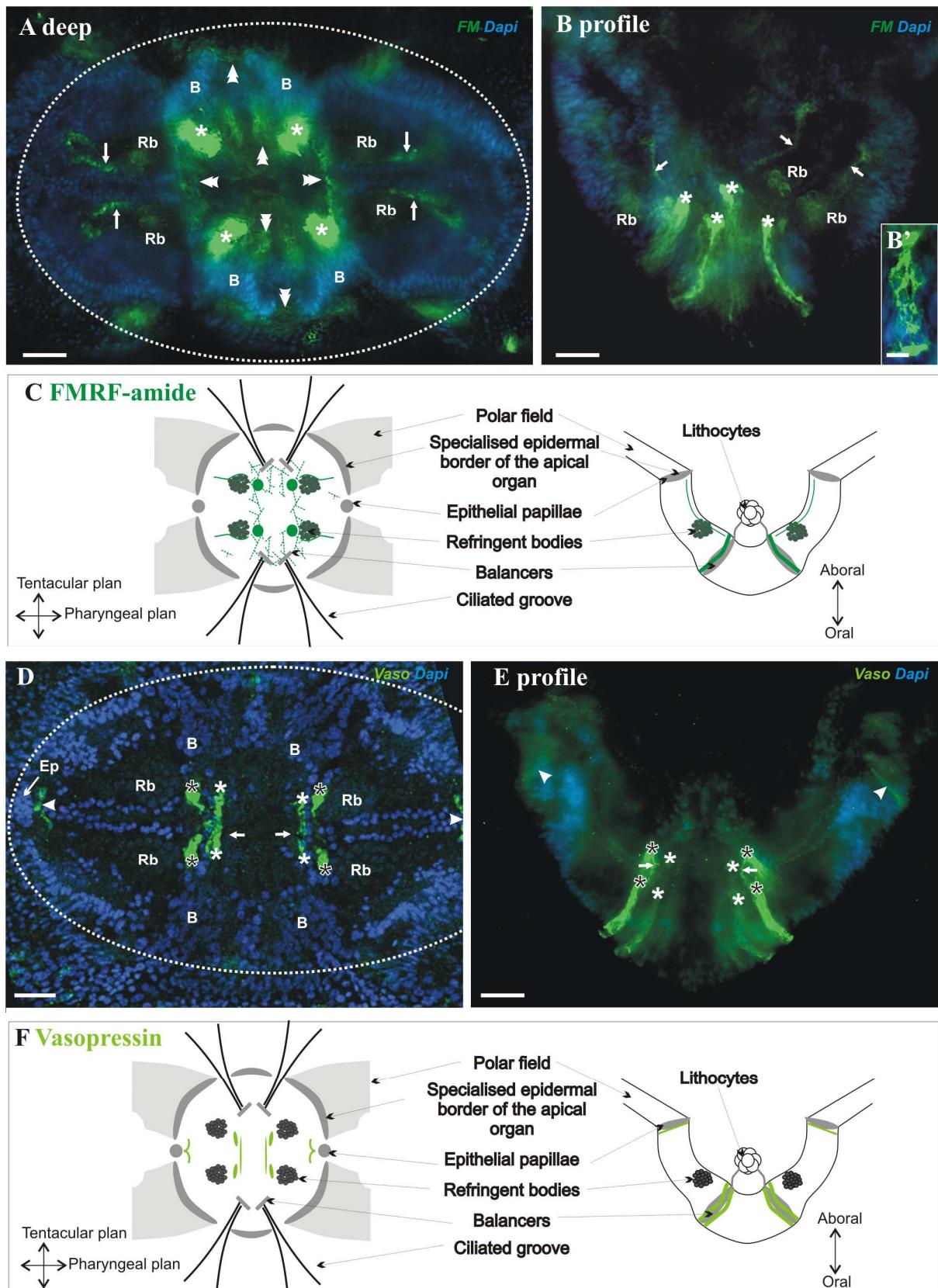
**Figure 4**



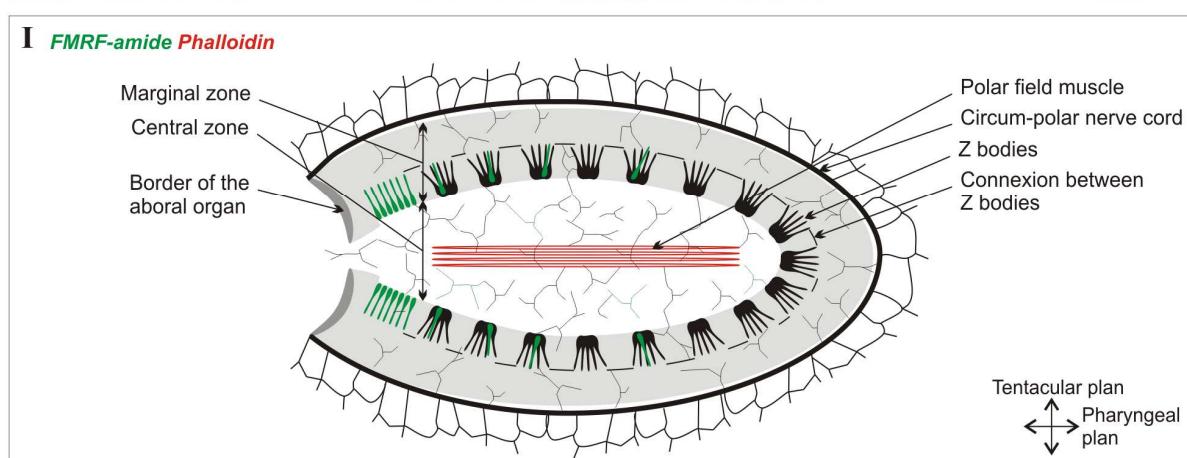
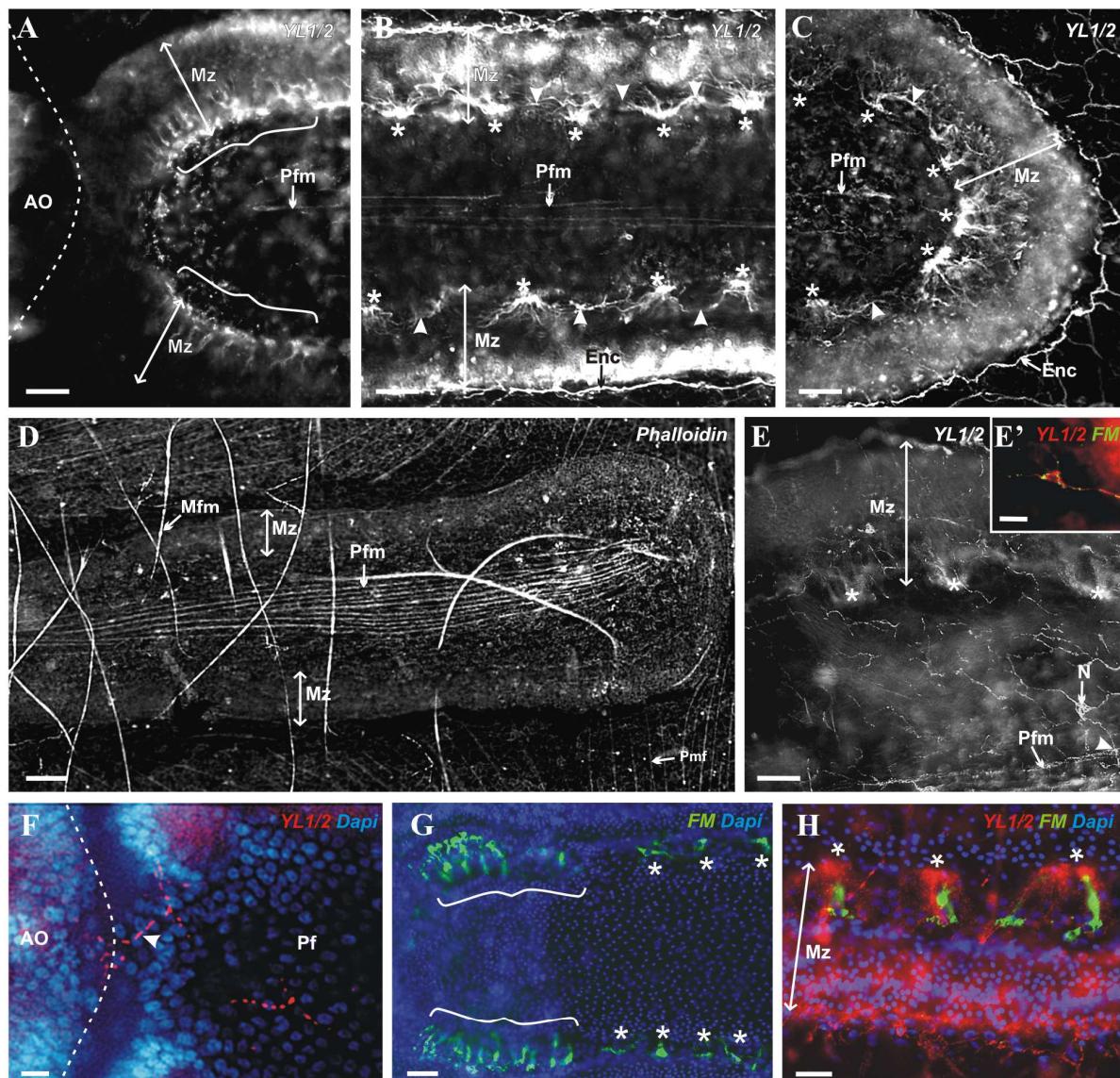
**Figure 5**



**Figure 6**



**Figure 7**



## Annexe 2.

Article 5 : Improved Phylogenomic Taxon Sampling Noticeably Affects Nonbilaterian Relationships

# Improved Phylogenomic Taxon Sampling Noticeably Affects Nonbilaterian Relationships

K.S. Pick,<sup>†,1</sup> H. Philippe,<sup>†,3</sup> F. Schreiber,<sup>4</sup> D. Erpenbeck,<sup>1</sup> D.J. Jackson,<sup>2</sup> P. Wrede,<sup>5</sup> M. Wiens,<sup>5</sup> A. Alié,<sup>6</sup> B. Morgenstern,<sup>4</sup> M. Manuel,<sup>6</sup> and G. Wörheide<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Department of Earth and Environmental Sciences, Palaeontology and Geobiology & GeoBio-Center<sup>LMU</sup>, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Germany

<sup>2</sup>Department of Geobiology, Courant Research Center Geobiology, Georg-August Universität Göttingen, Göttingen, Germany

<sup>3</sup>Centre Robert-Cedergren, Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>4</sup>Abteilung Bioinformatik, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen, Germany

<sup>5</sup>Department of Applied Molecular Biology, Institute for Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, Mainz, Germany

<sup>6</sup>University Pierre & Marie Curie (UPMC), Centre National de la Recherche Scientifique, Muséum National d'Histoire Naturelle, Department UMR7138 Systématique, Adaptation, Evolution. UPMC, Paris, France

<sup>†</sup>These authors contributed equally to the present study.

**\*Corresponding author:** E-mail: woerheide@lmu.de.

**Associate editor:** Manolo Gouy

## Abstract

Despite expanding data sets and advances in phylogenomic methods, deep-level metazoan relationships remain highly controversial. Recent phylogenomic analyses depart from classical concepts in recovering ctenophores as the earliest branching metazoan taxon and propose a sister-group relationship between sponges and cnidarians (e.g., Dunn CW, Hejnol A, Matus DQ, et al. (18 co-authors). 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452:745–749). Here, we argue that these results are artifacts stemming from insufficient taxon sampling and long-branch attraction (LBA). By increasing taxon sampling from previously unsampled nonbilaterians and using an identical gene set to that reported by Dunn et al., we recover monophyletic Porifera as the sister group to all other Metazoa. This suggests that the basal position of the fast-evolving Ctenophora proposed by Dunn et al. was due to LBA and that broad taxon sampling is of fundamental importance to metazoan phylogenomic analyses. Additionally, saturation in the Dunn et al. character set is comparatively high, possibly contributing to the poor support for some nonbilaterian nodes.

**Key words:** multigene analysis, EST, Metazoa, Ctenophora, Porifera, long-branch attraction, saturation.

Resolving the relationships of deep branching metazoan lineages is critical if we are to understand early animal evolution. Unraveling these relationships through the analysis of large-scale molecular data sets has recently given birth to the field of phylogenomics (e.g., Philippe et al. 2005). Despite significant advances in this field, recent studies have generated contradictory results regarding relationships within and between early diverging metazoan lineages: cnidarians, ctenophores (comb jellies), sponges, placozoans (anatomically the simplest extant metazoans), and bilaterians. Placozoans have historically been regarded by some as relicts of the metazoan ancestor (see summary by Schierwater 2005), and some recent analyses place Placozoa at the base of a group of nonbilaterian animals (DellaPorta et al. 2006; Schierwater et al. 2009). However, recent whole-genome (Srivastava et al. 2008) and phylogenomic (Philippe et al. 2009) analyses including *Trichoplax* recovered sponges as the sister group to all other metazoans in accordance with morphological analyses (Ax 1996). Such contradictory hypotheses regarding nonbilaterian metazoan relationships prevent a consensus view of metazoan evolution, a goal that is of fundamental importance if we hope to fully

understand the early evolution of animals (for an overview see Erpenbeck and Wörheide 2007).

A recent phylogenomic analysis adds further controversy to this debate (Dunn et al. 2008) (c.f., Hejnol et al. 2009). Their outcome is highly unusual as sponges form a clade with the Cnidaria, while the ctenophores (despite being morphologically derived) are proposed to be the earliest branching metazoan taxon. As suggested by Philippe et al. (2009), we hypothesized that a long-branch attraction (LBA) artifact was responsible for these controversial findings due to insufficient ingroup sampling and an inappropriate choice of outgroup taxa. Furthermore, the Placozoa are conspicuously absent from the Dunn et al. (2008) data set, and sponges are represented by only one Demospongiae and one Homoscleromorpha with no representatives of the remaining two extant sponge classes: Calcarea (Calcarispongiae or calcareous sponges) and Hexactinellida (glass sponges). Sparse taxon sampling is a common pitfall of phylogenetic analyses (Lecointre et al. 1993) and is largely responsible for the lack of a robustly supported nonbilaterian metazoan phylogeny (Erpenbeck and Wörheide 2007). With a largely different gene set (only 45 genes in common

with the 150 gene set of Dunn et al. (2008) and an increased sampling of nonbilaterian species, Philippe et al. (2009) obtained monophyletic sponges as the first-diverging metazoan lineage and a sister-group relationship between the Cnidaria and the Ctenophora.

To test whether insufficient sampling of nonbilaterian taxa and inappropriate outgroup choice adversely influenced the analyses performed by Dunn et al. (2008), we reanalyzed their 64-taxon matrix cleared of unstable taxa (leaf stability <90%) and with the following major modifications (cf. Baurain et al. 2007):

- 1) Ingroup taxon sampling was increased by the addition of nonbilaterian expressed sequence tag and genomic sequences. These included: 12 additional sponge taxa representing all four major sponge lineages; 1 additional ctenophore; 5 additional cnidarians (see [supplementary table S1](#), Supplementary Material online), and *Trichoplax adhaerens* (Placozoa).
- 2) We removed outgroup taxa with long branches. Long branches in the outgroup can strongly influence the topology of early branching ingroups (Philippe and Laurent 1998; Rota-Stabelli and Telford 2008). The long branches of the fungal outgroup are not visible in the cladogram of the PhyloBayes analysis (CAT + Γ4) of Dunn et al. (see their fig. 2) but are evident in their [supplementary figure S1](#) (Supplementary Material online). Consequently, we analyzed our data set with two sets of outgroups. First, using only choanoflagellates, the most likely sister group to all Metazoa (Carr et al. 2008), consisting of *Monosiga ovata* (shortest branch of outgroup taxa of Dunn et al.), *Monosiga brevicollis* (complete genome data), and *Proterospongia* sp.. Second, with more distant outgroups, such as those used by Dunn et al. (2008) (see [supplementary fig. S1](#) and [supplementary data](#), Supplementary Material online, for a detailed taxon list and methods used).

Furthermore, we eliminated errors (e.g., frameshifts) and refined the alignment of Dunn et al. (2008), for example, by reducing missing data and removing 2,150 ambiguously aligned positions (see [supplementary data](#), Supplementary Material online, for detailed procedures). Our extended data set with the choanoflagellate-only outgroup consists of 80 taxa and 19,002 characters. Using this data set we performed Bayesian phylogenetic analyses under the CAT + Γ4 model (Lartillot and Philippe 2004) and subsequent nonparametric bootstrapping (cf. Philippe et al. 2009).

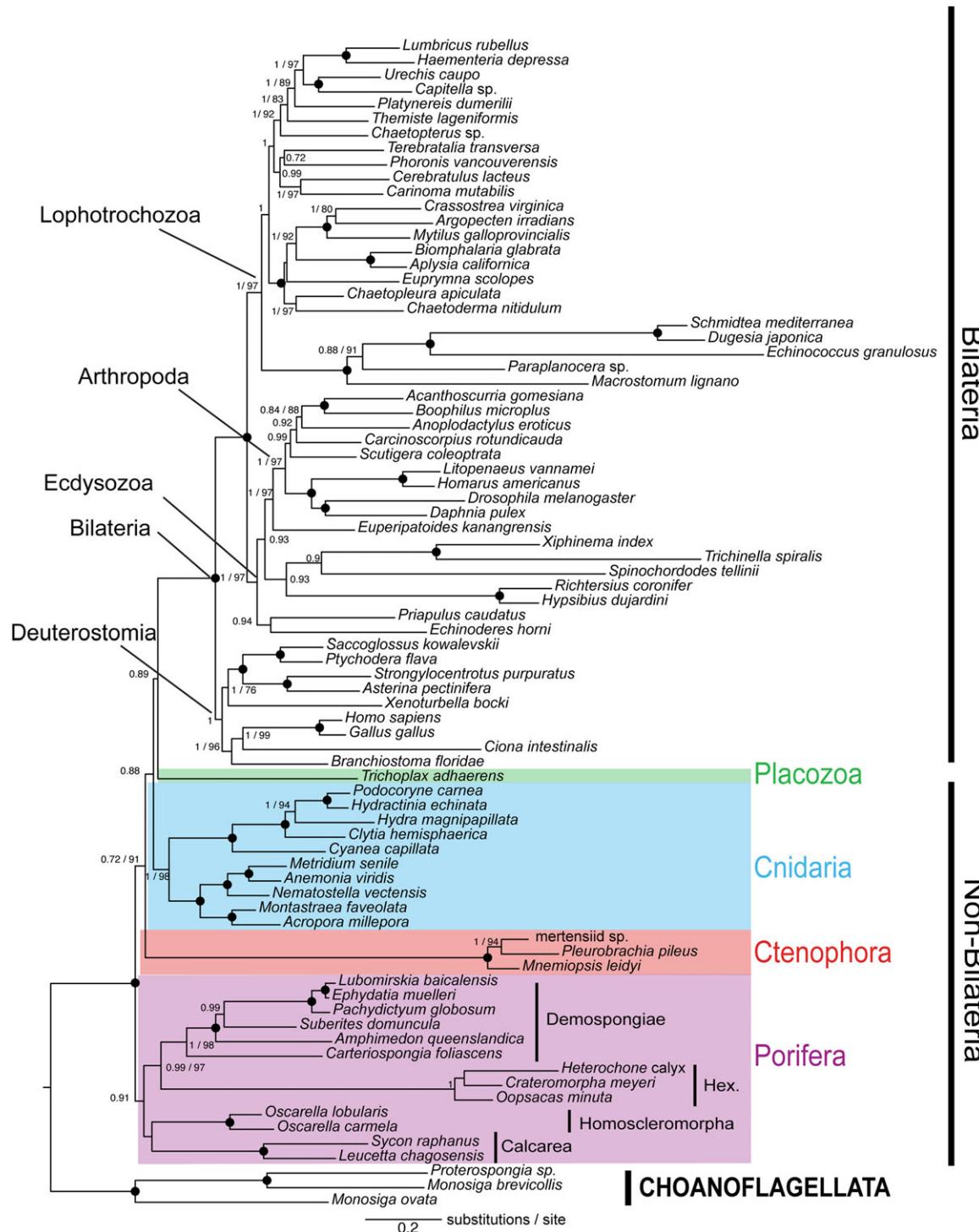
Contrary to Dunn et al. (2008), and also Hejnol et al. (2009), we recover sponges as the sister group to all other metazoan taxa ([fig. 1](#)). This is in congruence with earlier morphological (Ax 1996) and phylogenomic analyses (Philippe et al. 2009). In accordance with the latter study, we also recover sponges as a monophyletic group. The Homoscleromorpha, a taxon previously assigned to the Demospongiae (see Hooper and Van Soest 2002), are found to be the sister group to Calcarea as suggested by van Soest (1984) and Grothe (1989) based on morphology and subsequently by Dohrmann et al. (2008) based on ribosomal RNA (rRNA) data. Similarly, Hexactinellida and the

remaining Demospongiae sensu stricto form a monophyletic group (Silicea sensu stricto).

The basal position of ctenophores proposed by Dunn et al. (2008) was probably caused by the attraction of ctenophores to distant outgroup species, particularly fungi. In comparison, our reanalysis of the updated Dunn et al. (2008) data set with increased ingroup taxon sampling and a refined alignment indicates that LBA is reduced, independent of whether we use the choanoflagellate-only outgroup or more distant outgroups (see [fig. 1](#); [supplementary fig. S1](#), Supplementary Material online). This indicates that in-group taxon sampling and probably to a lesser extent data refinement are the most important parameters affecting nonbilaterian relationships.

Results of our analyses indicate that sponges are the sister group to the remaining Metazoa, and Placozoa are sister group to the Bilateria. We also recover both monophyletic Ctenophores and Cnidaria, but they are paraphyletic with respect to Placozoa + Bilateria ([fig. 1](#)). This is in contrast to the findings of Philippe et al. (2009) that supported the “Coelenterata hypothesis” (cf. Haeckel 1866), that is, a monophyletic Cnidaria + Ctenophora clade and a sister-group relationship between Coelenterata and Bilateria. However, support values for the position of Ctenophora, Cnidaria, and Placozoa in our analysis are either not significant (posterior probabilities <0.9) or low (bootstrap support <70%). We suspected that character set of Dunn et al. contains a substantial amount of nonphylogenetic signal due to multiple substitutions. To test this, we conducted a saturation analysis of inferred substitutions against observed amino acid differences ([fig. 2](#)). This revealed a higher saturation in the original Dunn et al. (2008) character set (slope = 0.38×) compared with the character set of Philippe et al. (2009) (slope = 0.46×) ([fig. 2](#)). From this we conclude that despite increasing the number of nonbilaterian taxa by a factor of 3 (from 9 to 27), multiple substitutions have partly masked phylogenetic signal contributing to the incongruent results reported here with those of Philippe et al. (2009). However, with the expanded and refined data set reported here, none of these incongruencies are statistically significant, indicating that nonphylogenetic signal has been reduced with respect to the original character set of Dunn et al. (2008). Furthermore, Dunn et al. (2008) recovered high support for the sister-group relationship of ctenophores to the remaining Metazoa—based on our analyses here, this hypothesis should be rejected (with a bootstrap value of 91%).

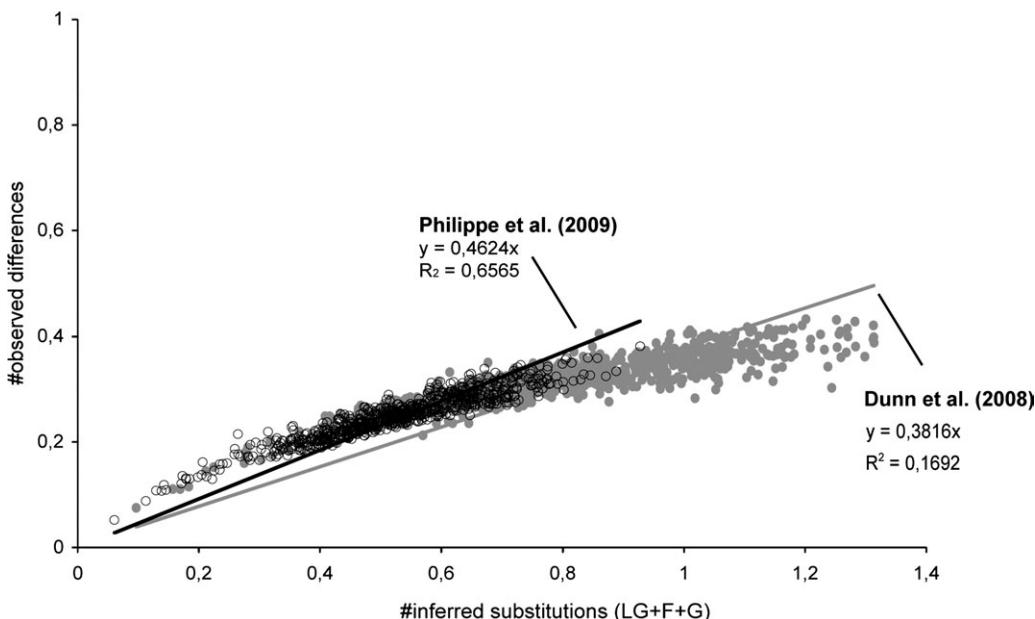
The inclusion of additional taxa has little influence on the relationships within and between bilaterian crown groups. Three of the four differences between the findings of Dunn et al. (2008) and our results affect the relationships of a single sequence within their well-defined clades (*Euprymna* within Mollusca, *Paraplanocera* within Platyhelminthes, and *Anoplodactylus* among the chelicerate arthropods). None of these splits were strongly supported in the original Dunn et al. (2008) analysis. Additionally, we do not recover Panarthropoda due to a difference in



**FIG. 1.** Phylogenetic tree based on refinements to the Dunn et al. (2008) 64-taxon set reconstructed with PhyloBayes (Lartillot et al. 2009) under the CAT + Γ4 model. Choanoflagellates were set as outgroup and an additional 18 nonbilaterian taxa included. Posterior probabilities  $>0.7$  are indicated followed by bootstrap support values  $>70$ . A large black dot indicates maximum support in posterior probabilities and Bayesian bootstraps ( $=1/100$ ).

the position of Tardigrada. Panarthropoda was also weakly supported in the Dunn et al. (2008) analysis (posterior probability values under WAG and CAT models were 0 and 0.86, respectively, and RAxML bootstrap support under the WAG model with 64 and 77 taxa was 4% and 2%, respectively).

Our results highlight the sensitivity of phylogenomic studies to ingroup taxon sampling and demonstrate the need for great care in the analysis and interpretation of large data sets. Character-rich analyses are thought to outperform character-poor analyses and have been suggested to be of greater importance than increased taxon sampling



**FIG. 2.** Saturation plot of character sets. See [Supplementary Material](#) for method details. Gray line and filled dots: Dunn et al. (2008). Black line and open dots: Philippe et al. (2009).

with regard to recovering robust metazoan phylogenies (Rokas and Carroll 2005). However, our analyses demonstrate the strong influence of taxon sampling, even though nonbilaterian taxa still remain underrepresented (Cnidaria: no Octocorallia, Ceriantharia, Cubozoa, or Staurozoa; Ctenophora: no Platyctenida, Beroida, or Cestida; just one placozoan strain etc.). The phylogenomic approach promises to reveal a well-resolved consensus metazoan tree, but it should not be assumed that a large data set will automatically produce a strong or correct phylogenetic signal (Jeffroy et al. 2006). A wide range of factors, such as saturation, LBA, the best fitting evolutionary model, and appropriate outgroup choice (Philippe et al. 2005), need to be carefully addressed before a fully resolved and robust animal tree of life will be realized.

## Supplementary Material

Supplementary figure S1, supplementary table S1, and [supplementary data](#) are available at *Molecular Biology and Evolution* online (<http://www.mbe.oxfordjournals.org/>).

## Acknowledgments

This study was supported by the German Science Foundation (DFG) through the Priority program SPP 1174 "Deep Metazoan Phylogeny" (Projects Wo896/6-1, 2; Wi 2116/2-1, 2). M. Kube and his team at the Max-Planck Institute for Molecular Genetics (Berlin, Germany) are acknowledged for library construction and expressed sequence tag sequencing, as well as I. Ebersberger and his team at the Center for Integrative Bioinformatics (Vienna, Austria) for their bioinformatic processing. We thank C. Eckert for some tissue samples. H.P. gratefully acknowledges financial support by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Canadian

Research Chair Program and the Université de Montréal, and the Réseau Québécois de Calcul de Haute Performance for computational resources. M.M. acknowledges the French Ministry of Research ("ACI jeunes chercheurs" and ANR NT\_NV\_52 Genocnidaire), the Consortium National de Recherche en Génomique, the Genoscope, and the Groupement d'Intérêt Scientifique Institut de la Génomique Marine for financial support. D.J.J. is supported by DFG funding to the Courant Research Centre for Geobiology, Göttingen.

## References

- Ax P. 1996. Das System der Metazoa. ein Lehrbuch der Phylogenetischen Systematik. Stuttgart (Germany): Gustav Fischer Verlag.
- Baurain D, Brinkmann H, Philippe H. 2007. Lack of resolution in the animal phylogeny: closely spaced cladogeneses or undetected systematic errors? *Mol Biol Evol*. 24:6–9.
- Carr M, Leadbeater BS, Hassan R, Nelson M, Baldauf SL. 2008. Molecular phylogeny of choanoflagellates, the sister group to Metazoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:16641–16646.
- Dellaporta SL, Xu A, Sagasser S, Jakob W, Moreno MA, Buss LW, Schierwater B. 2006. Mitochondrial genome of *Trichoplax adhaerens* supports placozoa as the basal lower metazoan phylum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:8751–8756.
- Dohrmann M, Janussen D, Reitner J, Collins A, Wörheide G. 2008. Phylogeny and evolution of glass sponges (Porifera: Hexactinellida). *Syst Biol*. 57:388–405.
- Dunn CW, Hejnol A, Matus DQ, et al. (18 co-authors). 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452:745–749.
- Erpenbeck D, Wörheide G. 2007. On the molecular phylogeny of sponges (Porifera). In: Zhang Z-Q, Shear WA, editors. Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy. Zootaxa 1668. Auckland (New Zealand): Magnolia Press. p. 107–126.
- Grothe F. 1989. On the phylogeny of homoscleromorphs. *Berl Geowiss Abh A*. 106:155–164.

- Haeckel EH. 1866. Generelle Morphologie der Organismen. Berlin (Germany): G. Reimer.
- Hejnol A, Obst M, Stamatakis A, et al. (17 co-authors). 2009. Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 276:4261–4270.
- Hooper JNA, Van Soest RWM. 2002. Systema Porifera. Guide to the Supraspecific Classification of Sponges and Spongiomorphs (Porifera). New York: Plenum.
- Jeffroy O, Brinkmann H, Delsuc F, Philippe H. 2006. Phylogenomics: the beginning of incongruence? *Trends Genet.* 22:225–231.
- Lartillot N, Lepage T, Blanquart S. 2009. PhyloBayes 3: a Bayesian software package for phylogenetic reconstruction and molecular dating. *Bioinformatics* 25:2286.
- Lartillot N, Philippe H. 2004. A Bayesian mixture model for across-site heterogeneities in the amino-acid replacement process. *Mol Biol Evol.* 21:1095–1109.
- Lecointre G, Philippe H, Van Le HL, Le Guyader H. 1993. Species sampling has a major impact on phylogenetic inference. *Mol Phylogenet Evol.* 2:205–224.
- Philippe H, Delsuc F, Brinkmann H, Lartillot N. 2005. Phylogenomics. *Ann Rev Ecol Syst.* 36:541–562.
- Philippe H, Derelle R, Lopez P, et al. (20 co-authors). 2009. Phylogenomics restores traditional views on deep animal relationships. *Curr Biol.* 19:706–712.
- Philippe H, Laurent J. 1998. How good are deep phylogenetic trees? *Curr Opin Genet Dev.* 8:616–623.
- Rokas A, Carroll SB. 2005. More genes or more taxa? The relative contribution of gene number and taxon number to phylogenetic accuracy. *Mol Biol Evol.* 22:1337–1344.
- Rota-Stabelli O, Telford MJ. 2008. A multi criterion approach for the selection of optimal outgroups in phylogeny: recovering some support for Mandibulata over Myriochelata using mitogenomics. *Mol Phylogenet Evol.* 48:103–111.
- Schierwater B. 2005. My favorite animal, *Trichoplax adhaerens*. *BioEssays* 27:1294–1302.
- Schierwater B, Eitel M, Jakob W, Osigus H, Hadrys H, Dellaporta S, Kolokotronis S, Desalle R, Penny D. 2009. Concatenated analysis sheds light on early metazoan evolution and fuels a modern “urmetazoon” hypothesis. *PLoS Biol.* 7:e20.
- Srivastava M, Begovic E, Chapman J, et al. (21 co-authors). 2008. The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans. *Nature* 454:955.
- van Soest RWM. 1984. Deficient *Merlia normani* from the Curaçao reefs, with a discussion on the phylogenetic interpretation of sclerosponges. *Bijdr Dierkd.* 54:211–219.