



## UNIVERSITÉ DE LA MÉDITERRANÉE

Centre d'Océanologie de Marseille

Unité Mixte de Recherche CNRS 6540 - DIMAR Diversité, Évolution et Écologie Fonctionnelle Marine

## THÈSE DE DOCTORAT

En Océanographie

### **Eve Gazave**

Etude de gène et voie de signalisation impliqués dans les processus morphogénétiques chez *Oscarella lobularis*: Implications potentielles sur la compréhension de l'origine du système nerveux

Soutenance prévue le 1<sup>er</sup> avril 2010 devant le jury composé de :

Dr. Sylvie Mazan, DEV- Roscoff :	Rapporteur
Pr. Didier Casane, LEGS - Université Paris VII :	Rapporteur
Pr. Michel Vervoort, IJM - Université Paris VII :	Examinateur
Dr. Nicolas Rabet, SAE - Université Paris VI :	Examinateur
Dr. Andrea Pasini, IBDML - Marseille:	Examinateur
Dr. Jean-Pierre Féral, DIMAR - Marseille :	Examinateur
Pr. Alexander Ereskovsky, Université de St Petersbourg:	Examinateur
Dr. Carole Borchiellini, DIMAR - Université de la Méditerranée:	Directrice de Thèse
Dr. Emmanuelle Renard, DIMAR - Université de la Méditerranée:	Directrice de Thèse





## REMERCIEMENTS

De nombreux remerciements de thèse commencent par « Enfin » ou « Il était temps », et je me suis souvent demandée pourquoi, car pour moi, ces années de thèses sont passées à la vitesse grand V. Mais après ces quelques mois de rédaction, je comprends parfaitement le sens de ces mots ! Voila donc enfin le moment d'écrire les remerciements et bien que cette partie de ma thèse soit la moins scientifique, je suis sure et certaine que ce sera la plus lue! Je vais donc essayer de n'oublier personne...

En premier lieu, je tiens à remercier Mr. Jean-Pierre Féral de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son unité de recherche DIMAR (UMR 6540) pendant ces 3 années et demi. Il m'a également soutenue dans mon projet de « summer course » en Embryology à Woods Hole, aux USA, l'été 2008.

Je souhaite aussi remercier les membres du jury (Sylvie Mazan, Didier Casane, Nicolas Rabet, Andrea Pasini, Jean-Pierre Féral, Michel Vervoort et Alexander Ereskovsky) d'avoir accepté de participer à cette soutenance de thèse, et les membres de mon comité de thèse (Michel Vervoort, Jean Vacelet, Alexander Ereskovsky, Michael Manuel, Ute Rothbacher, Nicole boury-Esnault) pour leurs conseils critiques et leur œil avisé.

Je tenais également à mentionner mes sources de financements : Marine Genomics et le Marine Biological Laboratory.

Je souhaite remercier tout particulièrement ma co-directrice de thèse : Carole Borchiellini. Notre rencontre au labo, il y a des années de cela, lors d'un stage de M1, a été décisive pour mon futur professionnel. Tu m'as toujours soutenue, défendue, tout en me laissant prendre mon envol. J'ai pu grâce à toi connaître le plaisir de mener à bien et en toute liberté mon projet de thèse. Tu m'as laissé m'épanouir dans cette thèse et m'as donné des responsabilités au sein de ton équipe, me permettant ainsi d'acquérir une autonomie indispensable à la continuation de ma carrière scientifique. Et je crois, sans trop m'avancer, que ce mode de fonctionnement nous a réussi à toutes les deux. Tu m'as également permis de participer à de nombreux cours et congrès aux quatre coins du monde afin que je rencontre du « beau monde » et fasse de la « politique », cet aspect de notre travail que tu aimes tant ! Merci aussi pour les 3 années passées à faire des PCR pour la phylogénie des homoscléromorphes … on y est presque.

Je remercie également tout particulièrement mon autre co-directrice de thèse : Emmanuelle Renard. Merci Emma pour ces 4 années passées dans ton bureau à discuter, dès que je le souhaitais, de ma thèse mais aussi de la vie en général ! Merci pour tes conseils, ta disponibilité et ta diplomatie (qualité qui me fait grandement défaut), cela nous aura permis d'avancer plus sereinement (sic) tout au long de cette thèse et de surmonter de nombreux problèmes. Merci de m'avoir poussé à me « vendre » dans ce milieu difficile et merci aussi pour ton aide dans ma recherche de post-doc et de demande de financement. Merci aussi pour ton implication dans l'article Notch. Un très grand merci également pour ces derniers mois de rédaction et pour les très nombreuses soirées que tu as sacrifiées pour mes corrections de chapitres !

Ma thèse ne serait pas ce qu'elle est sans mon collègue Pascal Lapébie. Notre association fructueuse, et ce dès notre M2, (bien que parfois accompagnée de frictions !), a permis un cumul de nos compétences et un avancement accéléré de nos thèses. Merci pour tous les calculs de M, m et n... Merci pour les plongées, les repas, soirées et discussions diverses et variées et blagues acides qui ont ponctué ces années de collaboration.

Je tiens également à remercier le plus provençal des Russes : Alexander Ereskovsky. Sacha, ta présence au sein du labo pendant plus de deux ans a été une expérience formidable. Ta motivation à toute épreuve et la passion que tu voues à ton métier, sont un exemple pour chacun d'entre nous. Et je n'ai qu'un seul souhait pouvoir avoir toujours la même motivation que toi. Merci pour ces plongées ensemble (et auxquelles j'ai survécu !) et pour ce mémorable classe IB que nous avons passé au GRASM. Merci pour ton implication dans ma thèse, pour tes conseils « politiques » et bien sûr scientifiques. Merci de m'avoir appris ta super technique du « Je te répète jusqu'à ce que tu changes d'avis », il semblerait que ça fonctionne ! Merci d'être toujours disponible pour moi, même depuis que tu es retourné à St Petersbourg. J'espère sincèrement que cette année sera la bonne et que tu pourras enfin être recruté au CNRS dans notre équipe (qui n'est bientôt plus la mienne) qui a tant besoin de toi afin que ton « favorite animal » perdure.

Un grand merci aux « anciens » Jean Vacelet et Nicole Boury-Esnault. Merci Janus pour votre disponibilité et votre gentillesse. Je me souviens de notre première rencontre, lors d'un stage avec Nicole où vous m'aviez montré, toujours avec la même passion comment faire une simple préparation de spicules, alors que vous en avez fait des milliers ! Merci pour votre aide et votre expertise des éponges tout au long de cette thèse. J'espère que vous pourrez continuer encore longtemps dans notre équipe, il vous reste tant de choses à faire et de jeunes à former et votre présence est indispensable à son bon fonctionnement. Merci Nicole pour m'avoir mis le pied à l'étrier pour travailler sur les éponges il y a un certain nombre d'années de cela déjà ! Merci pour ta disponibilité, pour ton implication dans ma thèse et pour l'article Axinella, bien que tu sois à la retraite. Merci aussi pour tes relectures de chapitres.

Merci aux autres membres du labo avec qui j'ai partagé ces quelques années : à Didier Aurelle de m'avoir supporté pendant des heures dans son bureau où je venais faire mes pauses thé-commérage-complainte avec mon amie Emilie ; à Anne Chenuil pour ses conseils et son aide pour l'article *Axinella* ; à Marc Bally pour sa gentillesse et ses conseils. Merci à Caroline Rocher pour sa participation à l'aventure phylogénie des homoscléromorphes et pour sa gestion du laboratoire ; à Chantal Bézac pour la réalisation des lames utilisées lors de ce travail et pour nos séances de bavardages sur le passé de la station marine d'Endoume ; aux membres du service plongée qui m'ont aidé lors de mes échantillonnages. Merci également à Joelle Massei pour sa gentillesse et sa sympathie, à la discrète Dacha pour son aide et sa gentillesse. Merci à Christian Marschal pour sa bonne humeur tout au long de ces années, mais également pour son aide quelque soit le problème rencontré et pour ses blagues.

Merci à Michael Manuel pour sa participation à mon article NK et pour les données utilisées dans l'article Notch. Je remercie également Frédéric Brunet pour son aide à la réalisation de la demande de financement Marine Genomics Women fellowship et pour m'avoir accueillie à Lyon dans son labo à l'IGFL.

Un grand merci à Michel Vervoort pour son aide tout au long de ma thèse et particulièrement pour l'article Notch. Merci d'avoir pensé à moi pour votre post doc, je suis sure que notre future collaboration avec toi et Guillaume Balavoine sera fructueuse.

Merci à Maja Adamska d'avoir souhaité que j'intègre son équipe, bien que ça n'ait pas marché. Nous aurons surement une autre occasion de travailler ensemble.

Durant ces quelques années à Endoume, j'ai aussi eu la chance de participer à l'encadrement de quelques stagiaires. Je remercie donc Elsa, Alexis et Thomas pour leur aide technique. Mention spéciale pour Jory particulièrement motivé et intéressé par la phylogénie des *Oscarella*.

Cette thèse ne pourrait s'être bien passée sans la présence de mes collègues de galère, les autres thésards et assimilés. Un grand merci pour leur soutien et présence au quotidien à Jba, Gwi, PA (et pour la table de matière de la présente thèse !), Kasia, Bastien, Jan, Olivier ; sans oublier ceux qui sont partis et/ou ont fini, Karin, Emilie B. Charlotte, Sarah (merci pour ce magnifique voyage en NC), Marcio. Un grand merci à Marie pour sa gentillesse, sa bonne humeur et pour les pauses de l'aprem dans son bureau. Une grand merci à vous tous, pour ces centaines de midi à la calanque, pause-thé-prince, soirées, repas.

Des remerciements tout spécialement pour ma grande amie Emilie, sans qui je ne sais pas comment j'aurai passé ces dernières années. Tu as toujours été là pour moi, à tous les niveaux et a écouté pendant des heures mes coups de gueules, de larmes, mes doutes ... On a refait le monde des dizaines de fois (avec guère de succès ceci dit car il n'a pas beaucoup changé !). Tu m'as également suivi dans mes choix parfois difficiles et soutenu sans faille. Je ne sais pas comment je vais faire à la grande ville sans toi. Ton chemin de thésarde a été grandement semé d'embuches et j'espère que tu pourras finir bientôt car tu le mérites.

Merci aux collègues et amis rencontrés au cours de cette thèse, en divers lieux : Marion Coolen, Alexandra Saudemont, Joao Cardoso (pour ces vacances à Faro), David Jandzik, Lucas Leclère (pour ton accueil à Bergen), Romain Derelle, Sofia Araujo (pour ton invitation à faire un séminaire dans ton labo à Barcelone), Claire Larroux, Patricia Wecker et Ronald Jenner (pour ton aide et ton soutien).

Je souhaite aussi remercier un inconnu, le créateur du site « Thèse de merde.fr ». J'ai un peu honte de l'avouer mais j'ai beaucoup ri devant les malheurs de mes compatriotes thésards de France !

Merci aux amis et gens du passé : Fred, Cédric, Sophie, Arnaud.

Cette thèse ainsi que les longues années d'études qui la précède n'auraient bien sûr pas pu se faire sans le soutien inconditionnel de mes parents. Ils ont cru en moi, souvent bien plus que moi, depuis toujours. Ils ont su m'écouter pendant des heures raconter mon quotidien d'étudiante en thèse parfois difficile et stressant bien qu'exaltant et passionnant.

Finalement, je remercie tous les gens qui m'ont supportée ces dernières semaines de rédaction alors que l'anxiété et la fatigue me rendaient parfois (un peu) désagréable !

Eve Endoume, le 16 Février 2010



## SOMMAIRE

Спат	οιτοτ Ι	15
CHAP		<u>13</u>
	L'APPORT DES ORGANISMES NON-BILATERIENS DANS UNE PERSPE COMPARATIVE	<u>ECTIVE</u> 15
A 1	DELATIONS DUVLOCEMETIQUES AU SEIN DES METAZOAIDES	
A]	KELA HONS PHYLOGENE HQUES AU SEIN DES METAZOAIRES	
A.1 :	Vision traditionnelle gradiste de l'evolution des metazoaires	19
A.2 :	Vision actuelle de la phylogenie des metazoaires	19
A.3 :	L'apport de la phylogenomique	
A.4 :	Les relations de parenté à la base de l'arbre : une situation toujours con	fuse25
A.4.1	: Les placozoaires ?	25
A.4.2	: Les cténophores ?	27
A.4.3	: Les éponges ?	
<b>B</b> ]	Les limites des organismes modeles traditionnels et l'apport des	3
MODE	LES NON-BILATERIENS	
<b>B.1</b> :	Prépondérance et limites des modèles bilatériens traditionnels	31
<b>B.2</b> :	Les « métazoaires basaux », des modèles émergents d'un intérêt tout par	ticulier
en bio	ologie du développement comparée	
B.2.1 :	: Cnidaires, cténophores et placozoaires	
B.2.2 :	: Les éponges	45
*	Présentation générale du phylum des spongiaires ou Porifera	
*	Une phylogénie interne toujours incertaine	
•	Enonges et Evo Dévo : un développement récent mais prometteur	53

<b>A</b> ]	INTRODUCTION
<b>B</b> ]	CARACTERISTIQUES D'OSCARELLA LOBULARIS
<b>B.1</b> :	Généralités sur notre animal « favori »63
B.1.1 :	Présentation de l'article
B.1.2 :	Article 1: The Homoscleromorph sponge Oscarella lobularis, a promising sponge
model	in evolutionary and developmental biology
<b>B.2</b> :	Cycle de vie et effort reproducteur de deux espèces d'Oscarella74
B.2.1 :	Présentation de l'article74
B.2.2 :	Article 2: Pluri-annual study of the reproduction of two Mediterranean Oscarella
species	e (Porifera, Homoscleromorpha): cycle, sex-ratio and reproductive effort
<b>B.3</b> :	Les Homoscléromorphes, la 4 <sup>e</sup> lignée d'éponges. Apports de la phylogénie
molécu	llaire associée aux caractères morphologiques99
B.3.1 :	Présentation de l'article99
B.3.2 :	Article 3: Molecular phylogeny restores the supra-generic subdivision of
Homos	ccleromorph (Dendy, 1905) sponges
<b>C</b> ]	AVANTAGES ET LIMITES DU MODELE OSCARELLA LOBULARIS
C.1 :	Récolte, maintien et développement en aquarium des spécimens adultes125
C.2:	Manipulations embryologiques
<b>D</b> ]	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES
Снар	
011111	ITRE III
	ITRE III
A] LE	ITRE III 135   L'ORIGINE DU SYSTEME NEURO-SENSORIEL DES METAZOAIRES135   SYSTEME NEURO-SENSORIEL
A] LE A.1 :	ITRE III
A] LE A.1 : A.2 :	ITRE III
A] LE A.1 : A.2 : A.2.1 :	ITRE III 135   L'ORIGINE DU SYSTEME NEURO-SENSORIEL DES METAZOAIRES135   SYSTEME NEURO-SENSORIEL
A] LE A.1 : A.2 : A.2.1 : A.2.2 :	ITRE III 135   L'ORIGINE DU SYSTEME NEURO-SENSORIEL DES METAZOAIRES135   SYSTEME NEURO-SENSORIEL
A] LE A.1 : A.2 : A.2.1 : A.2.2 : A.3 :	ITRE III 135   L'ORIGINE DU SYSTEME NEURO-SENSORIEL DES METAZOAIRES 135   SYSTEME NEURO-SENSORIEL 139   Définition du système nerveux / neuro-sensoriel 139   Morpho-anatomie du système neuro-sensoriel des eumétazoaires 141   Neurones et synapses 141   Neurones, neurones sensoriels, cellules sensorielles et structures sensorielles 145   Répartition des cellules neuronales dans les plans d'organisation : systèmes 145
A] LE A.1 : A.2 : A.2.1 : A.2.2 : A.3 : nerveu	ITRE III 135   L'ORIGINE DU SYSTEME NEURO-SENSORIEL DES METAZOAIRES
A] LE A.1 : A.2 : A.2.1 : A.2.2 : A.3 : nerveu A.4 :	ITRE III 135   L'ORIGINE DU SYSTEME NEURO-SENSORIEL DES METAZOAIRES
A] LE A.1 : A.2 : A.2.1 : A.2.2 : A.3 : nerveu A.4 : place o	ITRE III 135   L'ORIGINE DU SYSTEME NEURO-SENSORIEL DES METAZOAIRES
A] LE A.1 : A.2 : A.2.1 : A.2.2 : A.3 : nerveu A.4 : place o B]	ITRE III 135   L'ORIGINE DU SYSTEME NEURO-SENSORIEL DES METAZOAIRES 135   SYSTEME NEURO-SENSORIEL 139   Définition du système nerveux / neuro-sensoriel 139   Morpho-anatomie du système neuro-sensoriel des eumétazoaires 141   Neurones et synapses 141   Neurones, neurones sensoriels, cellules sensorielles et structures sensorielles 145   Répartition des cellules neuronales dans les plans d'organisation : systèmes 147   Conservation à l'échelle des eumétazoaires des gènes impliqués dans la mise en 141   Ne système nerveux 151   CONNAISSANCES ACTUELLES SUR L'ORIGINE DU SYSTEME NEURO-SENSORIEL : 147

<b>B.1</b> :	Présentation de l'article153
<b>B.2</b> :	Article 4: Origin of the neuro-sensory system : new and expected insights from
spong	es154
<b>C</b> ]	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES171
C	
CHAI	PITRE IV
	ETUDE D'UN GENE A HOMEOBOITE DE LA SUPER CLASSE
	ANTENNAPEDIA (ANTP)173
<b>A</b> ]	INTRODUCTION
A.1 :	Facteurs de transcription : fonctions et familles177
A.2:	Origine et évolution des facteurs de transcription179
A.3 :	Les gènes à homéoboîte et la super-classe Antennapedia (ANTP) chez les
métaz	oaires basaux
<b>B</b> ]	ETUDE DE L'EXPRESSION D'UN GENE NK CHEZ L'EPONGE OSCARELLA LOBULARIS 188
<b>B.1</b> :	Présentation de l'article188
<b>B.2</b> :	Article 5: NK homeobox genes with choanocyte-specific expression in
homo	scleromorph sponges
<b>C</b> ]	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES
C.1 :	Origine et évolution des facteurs de transcription201
C.2 :	Les cellules à collerette sont-elles à l'origine des cellules neurosensorielles ? 203
Сна	PITRE V 205
	LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH205
<b>A</b> ]	INTRODUCTION
A.1 :	Voies de signalisation et développement209
A.2:	Fonctionnement général de la voie Notch chez les bilatériens
A.3 :	Voie Notch et neurogenèse215
<b>B</b> ]	ETUDE DE L'ORIGINE ET DE L'EVOLUTION DE LA VOIE NOTCH
<b>B.1</b> :	Présentation de l'article217
<b>B.2</b> :	Article 6: Notch signalling pathway origin and evolution: an overview from
eukar	yotic genomes
<b>B.3</b> :	Conclusions et perspectives247
<b>C</b> ]	ETUDE DE LA VOIE NOTCH CHEZ OSCARELLA LOBULARIS

<b>C.1</b> :	Le répertoire Notch chez le modèle Oscarella lobularis	249
<b>C.2</b> :	Immunolocalisation de la protéine Notch	251
C.3 :	Expérience d'inhibition chimique de la voie Notch	255
<b>C.4</b> :	Perspectives d'étude de la voie Notch chez Oscarella lobularis	257
D]	CONCLUSION	261

<u>Chap</u>	PITRE VI	<u>265</u>
	<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<u>265</u>
<b>A</b> ]	<b>O</b> RIGINE ET EVOLUTION DU SYSTEME NEURO-SENSORIEL	269
A.1 :	Approche génétique : Identification de la «boîte à outils moléculaires» du sy	ystème
neuro-	-sensoriel ancestral des animaux, du «protoneurone» à « ursynapse »	271
A.2:	Approche physiologique : Identification de neurotransmetteurs	275
<b>B</b> ]	IDENTIFICATION DU TYPE CELLULAIRE NEUROSENSORIEL ANCESTRAL	277
<b>B.1</b> :	Les choanocytes ?	277
<b>B.2</b> :	Cellules pigmentées, « flask » cells et cellules globulaires des larves	281
B.2.1 :	« Flask » cells vs cellules globulaires	281
B.2.2 :	Cellules pigmentées	281
<b>B.3</b> :	Perspectives pour l'identification des types cellulaires potentiellement neuro	0-
sensor	iels chez les éponges	283
B.3.1 :	Familles de gènes d'intérêt particulier pour cette question	283
B.3.2 :	La recherche de neurotransmetteurs par immunolocalisation	285
B.3.3 :	L'approche physiologique : nécessité et difficulté	285
<b>C</b> ]	<b>EVOLUTION DES SYSTEMES DE CONDUCTION : CHIMIQUE</b> <i>VS</i> <b>ELECTRIQUE</b>	287
C.1 :	Conduction chimique paracrine	287
C.2 :	Conduction chimique synaptique	289
C.3 :	Conduction électrique	291

### 

ANNEXE I	
ARTICLE 7: POLYPHYLY OF THE GENUS AXINELLA AND	OF THE FAMILY
AXINELLIDAE (PORIFERA: DEMOSPONGIAE)	
ANNEXE II	

ARTICLE 8: <i>T-box</i> gene from the homoscleromorph sponge
<b>OSCARELLA SHEDS LIGHT ON THE ORIGIN OF MULTILAYERED ANIMALS</b>

ANNEXE III	
ARTICLE 9: WNT/B-CATENIN SIGNALLING AND EPITHELIAL	
PATTERNING IN THE HOMOSCLEROMORPH SPONGE OSCARELL	<u> A365</u>

ANNEXE IV	
PROTOCOLES D'IMMUNOHIS	TOCHIMIE ET D'INHIBITION CHIMIOUE 373

# **CHAPITRE I**

L'apport des organismes non-bilatériens dans une perspective comparative



Figure 1 : (A) Arbre phylogénétique des animaux dessiné par Ernst Haeckel en 1866 (Telford, 2006).

(B) Arbre phylogénétique illustrant le principe d'une complexification croissante des plans d'organisation des animaux (Adoutte *et al.*, 1999).

(C) Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 18S qui a conduit à la réévaluation de la classification des métazoaires (Adoutte *et al.*, 1999).

### A] Relations phylogénétiques au sein des métazoaires

#### *A.1* : *Vision traditionnelle gradiste de l'évolution des métazoaires*

En 1866, Haeckel représenta pour la première fois, les relations de parenté entre les animaux sous forme d'un arbre (Figure 1A). De nombreux groupes d'organismes qu'il y mentionne sont actuellement toujours valides bien que leurs relations de parenté ne s'accordent pas avec les concepts actuels de phylogénie des métazoaires (Telford, 2006). En effet, ces groupes, ou phylums, incluent des organismes possédant des plans d'organisation similaires et ont été définis sur l'analyse des caractères morphologiques et embryologiques (Adoutte et al., 1999). Cependant, les différences majeures au niveau des plans d'organisation entre certains phylums rendent l'établissement de leurs relations de parentés très difficile voire spéculatif. C'est pour cela qu'elles ont été longuement controversées. Bien qu'une profusion d'arbres phylogénétiques des métazoaires ait été proposée au XX<sup>e</sup> siècle, une hypothèse a finalement été considérée comme la plus robuste et son enseignement a perduré jusqu'à récemment (Grassé, 1994 ; Jenner, 2000). Selon ce scénario évolutif considéré comme « classique », les organismes se sont complexifiés au cours de l'évolution. Ainsi, les animaux « simples » sont apparus plus précocement et se situent à la base de l'arbre et les animaux les plus « complexes » sont apparus plus tardivement et sont situés au sommet de l'arbre (Hyman, 1940 ; Jenner, 2004). L'évolution serait ainsi synonyme de progrès. D'après cette hypothèse, les éponges (organismes considérés comme « simples ») seraient positionnées à la base de l'arbre, les cnidaires et les cténophores constitueraient les coelentérés ou radiata et les organismes triploblastiques (organismes considérés comme « complexes ») seraient divisés en trois clades (acoelomates, pseudocoelomates et coelomates) au sommet de l'arbre (Figure 1B).

#### A.2 : Vision actuelle de la phylogénie des métazoaires

Dans les années 1950, l'acquisition du concept de cladisme a permis l'établissement objectif des relations de parenté entre organismes (Hennig, 1950, 1966). Une approche cladistique consiste à établir les relations de parenté entre différents taxons en se basant sur le partage de

l'état dérivé des caractères considérés (état apomorphe). Ainsi, au sein d'un taxon, seuls les états dérivés partagés (ou synapomorphies) sont des indices de parenté. Les regroupements sur la base de ces synapomorphies conduisent à la création de groupes dits monophylétiques qui, actuellement, sont les seuls recevables (Lecointre et Le Guyader, 2001). Cette technique a, dans un premier temps, été utilisée sur des caractères morpho-anatomiques et ambryologiques.

Depuis le début des années 1990, l'apport de la biologie moléculaire a considérablement modifié notre compréhension de l'arbre du vivant (Halanych, 2004). Des progrès méthodologiques, tels que l'utilisation des séquences d'ADN pour inférer les relations de parents (Field et al., 1988), associés aux concepts phylogénétiques, tels que le cladisme, ont permis cette avancée scientifique majeure. Dans un premier temps, la phylogénie moléculaire a été majoritairement basée sur la comparaison de séquences d'ADN codant pour les ARN ribosomique 18S et 28S. L'étude de ces deux gènes chez de nombreux taxons d'animaux a permis l'émergence d'une nouvelle hypothèse phylogénétique des métazoaires, par laquelle la pensée gradiste de l'évolution a été fortement mise à mal (Adoutte et al., 1999 ; Adoutte et al., 2000 ; Graham, 2000 ; Halanych, 2004). D'après cette hypothèse qui a permis de confirmer la monophylie des métazoaires, les bilatériens seraient divisés en deux clades majeurs : les deuterostomiens et les protostomiens, ces derniers étant eux-même subdivisés en lophotrochozoaires (Adoutte et al., 1999; Adoutte et al., 2000) et ecdysozoaires (Figure 1C) (Aguinaldo et al., 1997). L'ancienne représentation « acoelomates-pseudocoelomatescoelomates » a ainsi volé en éclat. Avec la disparition de ces groupes, on a alors envisagé que les organismes dépourvus de cœlome le seraient devenus secondairement. La mise en évidence des pertes secondaires au cours de l'histoire évolutive de structures morphologiques a ainsi fait émerger l'idée que l'évolution peut être également simplificatrice (Selosse et Godelle, 2007).

Néanmoins, plus le nombre de gènes analysés est devenu important plus des conflits topologiques entre des phylogénies basées sur ces gènes traités individuellement sont apparus. De plus, les informations issues d'un seul gène se sont parfois révélées insuffisantes pour obtenir un support statistique fiable pour certains nœuds. Ainsi, avec les phylogénies moléculaires sont apparus des nouveaux types d'artefacts tels que l'effet d'attraction des longues branches. Ce type d'artefact apparaît lors de l'intégration dans un jeu de données de séquences ayant accumulé très rapidement des mutations (Aguinaldo *et al.*, 1997), entraînant un positionnement erroné dans l'arbre de l'espèce à qui appartient cette séquence,



Figure 2 : (A) Le principe de la phylogénomique : Les données génomiques issues d'un séquençage à grande échelle sont analysées, les gènes orthologues sélectionnés et alignés.

Approche de la super matrice : les gènes alignés sont concaténés et un seul arbre est généré.

Approche du super arbre : Les gènes alignés sont traités séparément et les arbres optimaux pour chaque gène sont combinés par la suite (Delsuc *et al.*, 2005).



Figure 2 :

(B) Exemple d'un arbre phylogénétique des métazoaires basé analyse sur une phylogénomique. Cet arbre simplifié est issu de l'analyse de 150 gènes chez 77 taxons, il confirme la séparation des bilatériens en trois clades principaux (Dunn et al., 2008).

engendrant des topologies fausses ou instables (Delsuc *et al.*, 2005). Ainsi, et ce malgré les avancées scientifiques spectaculaires réalisées, de nombreuses irrésolutions perdurent (Marletaz *et al.*, 2006).

C'est le cas par exemple de la base de l'arbre et des relations de parenté entre les taxons basaux (éponges, cténophores et placozoaires) qui restent des questions toujours fortement débattues (Dunn *et al.*, 2008 ; Srivastava *et al.*, 2008 ; Hejnol *et al.*, 2009 ; Philippe *et al.*, 2009).

#### *A.3* : L'apport de la phylogénomique

Actuellement, à l'ère de la génomique, la phylogénie des métazoaires est de nouveau en cours de réévaluation. En effet, grâce au séquencage de génomes complets d'espèces appartenant à divers taxons ainsi que la génération de nombreuses banques d'Expressed Sequence Tags (EST), nous avons maintenant à notre disposition une grande quantité de données moléculaires. Les reconstructions phylogénétiques peuvent désormais se baser sur l'analyse de nombreux gènes afin de constituer de nombreux alignements protéiques, susceptibles d'être analysés après concaténation en un super-gène. L'augmentation du nombre de caractères analysés est considérée comme un moyen d'accroître la robustesse des hypothèses proposées (Figure 2A). L'analyse de ces nouvelles données via cette approche de « phylogénomique » (Delsuc et al., 2005 ; Philippe et Telford, 2006) a fourni des informations complémentaires pour réévaluer l'arbre phylogénétique des animaux et leurs origines (Ruiz-Trillo et al., 2008). La proposition importante de la monophylie des bilatériens et de leur subdivision en trois clades (deuterostomiens, lophotrochozoaires et ecdysozoaires), faite suite aux analyses de l'ADNr 18S, a été ainsi confirmée (Figure 2B). Cette nouvelle technique, associée à l'élaboration de nouvelles méthodes d'analyses (nouveaux algorithmes) (Lartillot et Philippe, 2004), a permis de surmonter, partiellement du moins, les problèmes d'artefacts précédemment rencontrés mais a également prouvé son efficacité pour résoudre des positions restées jusqu'alors conflictuelles au sein des bilatériens (Philippe *et al.*, 2005 ; Philippe et Telford, 2006; Philippe et al., 2007; Dunn et al., 2008; Philippe et al., 2009). A l'heure actuelle, la majorité des données exploitables concerne les bilatériens et très peu de génomes d'organismes non-bilatériens ont été séquencés. Ainsi, trois analyses phylogénomiques proposent trois scénarios évolutifs différents en ce qui concerne la base de



Figure 3 : (A) Schéma simplifié représentant l'hypothèse du positionnement basal des placozoaires. (B) Arbre phylogénétique des métazoaires basé sur l'analyse de 12 gènes mitochondriaux concaténés (en maximum de vraisemblance et bayésien), plaçant les placozoaires à la base (Signorovitch *et al.*, 2007). (C) Arbre phylogénétique des eucaryotes (en maximum de vraisemblance) issu de l'analyse concaténant des données morphologiques, de structures secondaires, de gènes mitochondriaux et nucléaires. La position basale des placozoaires est retrouvée (Schierwater *et al.*, 2009b).

l'arbre (Dunn *et al.*, 2008 ; Srivastava *et al.*, 2008 ; Philippe *et al.*, 2009) générant de nombreux débats et discussions animés au sein de la communauté scientifique (DeSalle et Schierwater, 2008).

# *A.4* : Les relations de parenté à la base de l'arbre : une situation toujours confuse

Il existe quatre groupes d'organismes dits non-bilatériens ou métazoaires « basaux » : les cnidaires, les cténophores, les placozoaires et les éponges. Alors que la position des cnidaires comme groupe frère des bilatériens est soutenue par la majorité des analyses (Putnam *et al.*, 2007 ; Hejnol *et al.*, 2009 ; Philippe *et al.*, 2009), le branchement des trois autres groupes par rapport aux bilatériens et les uns par rapport aux autres reste toujours incertain. La quasitotalité des scénarios concevables a déjà été proposée (exceptée la monophylie de ces trois taxons) dans divers travaux de phylogénies morphologiques ou moléculaires (basés sur différents marqueurs). Ces topologies incongruentes reflètent très vraisemblablement des lacunes au niveau des taxons choisis pour ces études : ceux-ci ne sont pas forcément judicieusement sélectionnés (évolution trop rapide, organismes dérivés secondairement ...) et ne reflètent pas la diversité des métazoaires basaux (Hedtke *et al.*, 2006 ; Baurain *et al.*, 2007). Il est également fort probable que ces incohérences soient dues à des quantités de données disponibles insuffisantes pour certains taxons (Hejnol *et al.*, 2009 ; Philippe *et al.*, 2009) ou au choix des modèles de reconstruction sélectionnés (Delsuc *et al.*, 2005 ; Baurain *et al.*, 2007).

#### A.4.1 : Les placozoaires ?

Certains auteurs envisagent de placer le taxon des placozoaires à la base de l'arbre, *Trichoplax adhaerens* étant le seul représentant actuel de cette lignée évolutive (Figure 3). La majorité des travaux proposant cette topologie est basée sur l'étude de génomes mitochondriaux (Dellaporta *et al.*, 2006 ; Haen *et al.*, 2007 ; Signorovitch *et al.*, 2007 ; Wang et Lavrov, 2007, 2008) (Figure 3A). D'autres analyses moins nombreuses, basées sur l'étude



de gènes nucléaires ou sur la concaténation de données moléculaires, de structures secondaires et de gènes mitochondriaux et nucléaires (Schierwater *et al.*, 2009a ; Schierwater *et al.*, 2009b), appuient également cette topologie (Figure 3B). Il est cependant intéressant de noter que les auteurs des travaux basés sur l'étude des génomes mitochondriaux ont également proposé plus récemment une hypothèse contradictoire dans leur travail de phylogénomique où *Trichoplax* se placerait comme groupe frère des eumétazoaires. Ils considèrent que les résultats précédemment obtenus lors des analyses mitochondriales seraient biaisés et sujets au phénomène d'attraction des longues branches (Srivastava *et al.*, 2008). Dans les analyses de phylogénomique les plus récentes, *Trichoplax* se place soit comme groupe frère d'un clade (homoscleromorphes + eumétazoaires) (Hejnol *et al.*, 2009), soit comme groupe frère des eumétazoaires (Philippe *et al.*, 2009).

#### A.4.2 : Les cténophores ?

Récemment, deux analyses phylogénétiques basées pour la première fois sur un nombre de taxons considérable (77 et 94 taxons respectivement) ont proposé une topologie originale (Figure 4). Les auteurs placent ainsi les cténophores à la base de l'arbre (Dunn et al., 2008 ; Hejnol et al., 2009) (Figure 4). Cette hypothèse n'avait jamais été évoquée jusqu'alors. Néanmoins, il est à noter que l'effort d'échantillonnage pour ces études a été concentré tout particulièrement au niveau des bilatériens. En effet, le choix des taxons à la base de l'arbre n'est ni très représentatif, ni très complet (seules deux lignées d'éponges et trois espèces de cténophores sont présentes). De plus, pour ces groupes, les taux de données manquantes sont importants : seulement 65 à 315 gènes (sur 1497) ont été identifiés dans les collections d'EST disponibles. Les auteurs considèrent que l'impact des données manquantes est peu important mais admettent dans leur conclusion que ce placement des cténophores à la base doit être considéré comme provisoire, leur échantillonnage étant relativement peu adapté à la résolution de cette question cruciale et un phénomène d'attraction des longues branches étant suspecté. Cependant, une autre analyse phylogénomique (Philippe et al., 2009) propose des relations de groupes frères entre cnidaires et cténophores, réactualisant l'ancien clade des Coelenterata.



Figure 5 : (A) Consensus strict issu d'une analyse morphologique (138 caractères) en maximum de parcimonie (Peterson et Eernisse, 2001). Schéma simplifié représentant cette hypothèse et le positionnement basal des éponges. (B) Arbre issu d'une analyse de phylogénomique fondée sur 128 gènes nucléaires issus de 55 taxons et analysés en bayésien (Philippe *et al.*, 2009). Schéma simplifié représentant cette hypothèse et le positionnement basal des éponges.

#### A.4.3 : Les éponges ?

Les éponges ont été très souvent positionnées à la base de l'arbre quel que soit le type d'analyses utilisé. Ce fut dans un premier temps le cas lors des études cladistiques basées uniquement sur des caractères morphologiques (Nielsen et al., 1996). Par la suite, des études de phylogénies moléculaires basées sur les ADNr 18S et 28S (Borchiellini et al., 1998 ; Borchiellini et al., 2001; Medina et al., 2001; Medina et al., 2003; Borchiellini et al., 2004; Da Silva et al., 2007 ; Mallatt et al., 2009) ou des analyses combinées morphologie/18S (Zrzavy et al., 1998 ; Peterson et Eernisse, 2001) ont présenté des résultats similaires (Figure 5A). Bien plus récemment, un travail sur des gènes nucléaires (Sperling et al., 2007) a également montré la position basale des éponges au sein des métazoaires. Ces deux dernières années, avec l'essor des analyses phylogénomiques, deux autres travaux ont également appuyé cette hypothèse (Srivastava et al., 2008; Philippe et al., 2009). L'étude de Philippe et al. (2009) est à l'heure actuelle la seule étude phylogénomique dont l'échantillonnage a été spécifiquement choisi afin de répondre à la problématique de l'irrésolution de la base de l'arbre des métazoaires. Cette étude comprend neuf espèces d'éponges appartenant aux quatre lignées définies actuellement, le placozoaire Trichoplax adhaerens ainsi que trois espèces de cténophores. Malgré des pourcentages de données manquantes assez conséquents pour certaines espèces d'éponges (allant jusqu'à 88 %), les auteurs considèrent que cela n'affecte en rien la robustesse de leurs analyses et donc du positionnement des éponges à la base de l'arbre des animaux (Figure 5B).

Par conséquent, lors de ce travail de thèse, nous avons choisi de favoriser cette dernière hypothèse proposant les éponges comme étant le phylum le plus basal.



Figure 6 : Arbre schématique représentant la majorité des taxons d'animaux (à ne pas interpréter en termes de phylogénie des métazoaires) et illustrant la position des principaux six organismes modèles. Les « big six » sont indiqués par un « M », les « m » faisant référence à d'autres organismes considérés comme modèles mineurs (Jenner et Wills, 2007).

## B] Les limites des organismes modèles traditionnels et l'apport des modèles non-bilatériens

#### B.1 : Prépondérance et limites des modèles bilatériens traditionnels

Au XIX<sup>e</sup> siècle, les embryologistes ont basé leurs théories sur l'étude d'une multitude d'organismes, comme illustré par la « Gastrea Theory » de Haeckel (1874) issue de travaux sur le développement embryonnaire de divers taxons (amphioxus, ascidie, éponges, oursins, cténophores ...). Par opposition, les biologistes du XX<sup>e</sup> siècle, se sont principalement concentrés sur l'étude d'un nombre limité de modèles tels que Mus musculus et Drosophila melanogaster, dans un premier temps, puis Danio rerio, Xenopus laevis et Caenorhabditis elegans (Figure 6); encore appelés les « big six » par Jenner (Jenner et Wills, 2007). Ces modèles dits « classiques » ont été initialement sélectionnés pour leur facilité d'étude en laboratoire (temps de génération court, taille réduite, élevage facile...) ainsi que leur potentiel pour répondre à de nombreux et divers problèmes biologiques. Les vertébrés étaient choisis pour nous renseigner sur l'espèce humaine et l'on se souciait peu, pour les non-vertébrés, de leur position phylogénétique. Cette concentration d'efforts sur peu de modèles a rapidement permis l'acquisition de données et de techniques. Ces organismes sont devenus, de fait, des modèles prépondérants pendant plusieurs années (Crotty et Gann, 2009). Il est maintenant communément admis que ces « big six » ne sont pas un échantillon représentatif des animaux et ne permettent pas de répondre à toutes les questions concernant l'évolution animale (Figure 6). En effet, ils ne sont pas représentatifs de la diversité biologique au sein même des bilatériens et de profondes inégalités dans les modèles étudiés perdurent (Love, 2009): la très grande majorité des données a été acquise chez les ecdysozoaires et les deutérostomiens (et voire même plus précisément sur les vertébrés). Les lophotrochozoaires, qui constituent la 3<sup>e</sup> lignée de bilatériens, ont été jusqu'il y a peu fortement négligés (Kerner, 2009). De plus, chacun de ces six modèles ne peut être considéré comme représentatif de son groupe compte tenu des différences observées dans les modes de développement.

Les conclusions basées uniquement sur cet échantillonnage réduit ne peuvent être considérées comme universelles. Cependant, la tendance à généraliser sans réelle justification les processus observés chez une espèce n'est pas rare. De nombreux exemples ont prouvé la

non représentativité de certaines espèces modèles à divers niveaux d'étude : mécanismes spécifiques à l'espèce, acquisitions, divergences ou pertes secondaires dans la lignée. Ainsi, des gènes considérés comme des innovations des vertébrés se sont révélés *a posteriori* être en réalité spécifiquement perdus chez le nématode et la drosophile. Par exemple, 11 % des EST d'*Acropora millepora* présentent des gènes homologues à des gènes humains et aucun homologue chez la mouche ou le nématode (Kortschak *et al.*, 2003). Seule l'approche comparative entre un plus grand nombre d'espèces s'avère être pertinente (Jenner et Wills, 2007).

# *B.2* : Les « métazoaires basaux », des modèles émergents d'un intérêt tout particulier en biologie du développement comparée

Cette prise de conscience de la nécessité d'une approche comparative et de l'importance de la position phylogénétique des modèles a suscité un intérêt accru pour l'étude d'organismes appartenant aux groupes d'animaux ayant divergé tôt dans l'histoire des métazoaires. Bien que l'emploi du terme «basal» soit parfois utilisé à mauvais escient ou non défini dans certaines publications, ce terme désigne en général des taxons dont les lignées ont émergé précocement (Collins, 2005). Il faut néanmoins se méfier de l'idée simple, fausse et assez répandue qui suppose que ces lignées dites «basales» présentent les caractères les plus primitifs ou ancestraux (Jenner, 2006). En effet, l'état d'un caractère retrouvé chez ces organismes ne reflète pas forcément l'état ancestral. De plus, au sein d'un clade d'espèces, toutes les espèces terminales sont pareillement reliées à leur ancêtre commun et ont évolué durant le même laps de temps (Jenner et Wills, 2007).

Ces métazoaires situés à la base de l'arbre des animaux sont les groupes externes des bilatériens et cette position phylogénétique cruciale leur confère des atouts uniques. En effet, la connaissance détaillée et la comparaison des processus développementaux ainsi que du répertoire génétique de ces espèces permettent d'émettre des hypothèses sur la « boîte à outils moléculaires » de l'ancêtre commun de tous les animaux : Urmetazoa (Müller, 2001 ; Müller *et al.*, 2001). Ils sont indispensables pour concevoir et évaluer des hypothèses concernant l'origine et l'évolution précoce des métazoaires et leur diversification. Jusqu'alors ces organismes considérés comme simples et sans intérêt avaient été fortement négligés.

A l'ère du séquençage massif de génomes d'organismes variés, l'acquisition de données moléculaires chez beaucoup d'organismes, jusqu'alors jugés marginaux, est désormais









Figure 7 : Les modèles cnidaires prépondérants en évo-dévo (A) Dessins de cnidaires (Ernst Haeckel) (B) *Hydra sp.* (C) *Nematostella vectensis* (D) *Clytia hemisphaerica* Crédits photos : <u>http://www.mbl.edu/news/press\_releases/image</u> <u>s/nematostella\_adult\_eggs.jpg</u> <u>http://biodev.obs-</u> <u>vlfr.fr/recherche/houliston/Clytia/ClytiaPhotos</u> <u>Films.html</u> <u>http://www.nig.ac.jp/labs/OntoGen/hydra-</u> <u>sugi.jpg</u> devenue beaucoup plus simple (Steele, 2005) et on assiste à une inversion de la tendance qui consistait à focaliser tous les efforts sur des organismes phares. De plus en plus de biologistes ne concentrent plus uniquement leurs intérêts sur l'approche purement mécanistique des processus développementaux mais tiennent compte également de considérations évolutionnistes (Crotty et Gann, 2009). Parmi les organismes qui bénéficient de cette nouvelle tendance, on trouve les non-bilatériens (les cnidaires, les cténophores, les placozoaires et les éponges). Ces dernières qui font l'objet de ma thèse seront particulièrement développées dans une partie séparée.

#### **B.2.1 : Cnidaires, cténophores et placozoaires**

L'intérêt des cnidaires réside dans le fait qu'ils sont actuellement considérés comme le groupe-frère des bilatériens. De ce fait, ce sont les métazoaires basaux les plus étudiés et donc les mieux caractérisés à l'heure actuelle. Il y a environ 11 000 espèces décrites, majoritairement marines (bien que certaines espèces vivent en eau douce, comme l'hydre) (Figure 7A).

Dans un premier temps l'hydre d'eau douce (Hydra vulgaris ou Hydra magnipapillata), déjà fortement étudié en embryologie expérimentale fut le modèle cnidaire majeur en évo-dévo des non-bilatériens (Steele, 2002 ; Hoffmeister-Ullerich, 2007) (Figure 7B). Ses facilités d'élevage en aquarium d'eau douce, ses capacités de régénération et de bourgeonnement (Galliot et Schmid, 2002 ; Holstein et al., 2003) associées à la disponibilité de génomes complets (en plus des EST) en ont fait un organisme de choix aux atouts considérables. Néanmoins, la grande variété de modes de vie (benthique, pélagique, solitaire, colonial) et de cycles de vie (stade polype, stade méduse, alternance des deux avec une prédominance de l'une ou l'autre des stades) a justifié de s'intéresser à d'autres modèles (Denker, 2008). Plus récemment, le modèle anthozoaire Nematostella vectensis a émergé (Darling et al., 2005) et le séquençage complet de son génome a été rapidement réalisé (Putnam et al., 2007) (Figure 7C). Cette anémone de mer est particulièrement utile pour l'étude de la reproduction sexuée et des stades embryonnaires précoces. Malgré la suprématie de ces deux organismes au niveau mondial, certaines équipes ont souhaité développer d'autres modèles afin de répondre à des questions différentes, mais également, comme nous l'avons déjà souligné, car la stratégie de multiplication des modèles apparaît actuellement comme judicieuse. C'est le cas des équipes







Figure 8 : Les modèles cténophores prépondérants en évo-dévo. (A) Dessins de cténophores (Ernst Haeckel) (B) *Mnemiopsis leidy* (C) *Pleurobrachia pileus* Crédits photos : <u>http://lavidamaravillosa.files.wordpr</u> ess.com/2009/10/ctenophora\_mnemi opsis.jpg http://www.seawater.no/fauna/Ribbe maneter/images/CRW\_7111.jpg
d'Evelyn Houliston<sup>1</sup> et Michaël Manuel<sup>2</sup> qui visent à promouvoir un nouveau modèle hydrozoaire colonial: *Clytia hemisphaerica* (Figure 7D). Contrairement aux deux modèles précédemment développés, ce cnidaire transparent possède une génération méduse ayant des caractéristiques particulières, notamment un système nerveux fortement différencié.

Son cycle peut être complet en laboratoire et la ponte est parfaitement contrôlable par un cycle de phases de lumière et d'obscurité (Manuel, 2007 ; Amiel, 2008 ; Denker, 2008).

Ce modèle récent a déjà prouvé son intérêt pour la résolution de diverses questions, notamment pour la compréhension de la mise en place des axes de symétrie et du système nerveux (Momose et Houliston, 2007 ; Denker *et al.*, 2008a ; Amiel et Houliston, 2009 ; Chiori *et al.*, 2009) et le séquençage complet de son génome est envisagé. Parallèlement à ces trois modèles, des EST ont été développées chez d'autres espèces que l'on a tenté de positionner en tant que modèles cnidaires avec plus ou moins de succès. C'est le cas notamment de l'hydraire *Hydractinia spp*. (Frank *et al.*, 2001); de l'anthozoaire *Acropora millepora* (Miller et Ball, 2000 ; Miller *et al.*, 2000 ; Technau *et al.*, 2005 ; Schwarz *et al.*, 2008) ; des hydrozoaires *Podocoryne carnea* (Bosch, 2004) et *Eleutheria dichotoma* (Kamm *et al.*, 2006 ; Jakob et Schierwater, 2007). Des études fonctionnelles sur plusieurs espèces de cnidaires (*via* l'utilisation de morpholinos ou RNAi) sont également réalisées depuis plus d'une dizaine d'années (Lohmann *et al.*, 1999 ; Jakob et Schierwater, 2007) et des lignées transgéniques d'*Hydra vulgaris* ont été créées (Wittlieb *et al.*, 2006).

Les cténophores ou cténaires, dont la position phylogénétique est actuellement toujours débattue comme nous l'avons montré précédemment, sont à ce jour un groupe d'organismes assez peu étudié en évo-dévo, de par leur difficulté d'obtention et leur fragilité notamment (Pang et Martindale, 2008a). Ces animaux marins transparents sont pour la plupart planctoniques, d'aspect gélatineux et mesurent de quelques centimètres à plus d'un mètre. Il y a actuellement 150 à 200 espèces décrites. Ils possèdent huit rangées longitudinales de cils appelées peignes et leur corps a une symétrie biradiaire (Derelle, 2007 ; Manuel, 2007 ; Pang et Martindale, 2008a) (Figure 8A). Seules deux équipes au monde ont décidé de travailler sur ce taxon, en tentant de développer deux modèles cténaires qui sont *Mnemiopsis leidy* et *Pleurobrachia pileus* pour lesquels des EST sont actuellement disponibles. L'équipe de Mark Martindale<sup>3</sup> se focalise sur la première (Figure 8B), notamment avec des études de traçage de lignées cellulaires (lignage) et embryologiques

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Villefranche sur mer, Laboratoire du Biologie du Développement, UMR 7009

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Paris, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, Laboratoire Systématiques, Adaptation, Evolution, UMR 7138

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Kewalo Marine Laboratory, Hawaï





Figure 9 : Le modèle placozoaire.(A) Schéma représentant les feuillets et cellules de *Trichoplax adhaerens*.(B) Microphotographie de *Trichoplax adhaerens*.

Crédits photos : http://www.fofweb.com/Electronic\_Image s/onfiles/SciAniAnat2-06c.gif http://genome.jgipsf.org/Triad1/placozoan\_signorovitch.jpg (Martindale et Henry, 1997, 1999 ; Henry et Martindale, 2004), de régénération (Henry et Martindale, 2000) et d'expression de gènes du développement (Yamada et Martindale, 2002 ; Yamada *et al.*, 2007 ; Pang et Martindale, 2008b). L'équipe française de M. Manuel développe le second modèle en se focalisant sur l'étude de l'expression des gènes chez l'adulte (Derelle et Manuel, 2007 ; Jager *et al.*, 2008) (Figure 8C). Des expériences de manipulations fonctionnelles (knock down et sauvetage) sur *Mnemiopsis leidy* (*via* l'injection de morpholinos et d'ARN) viennent pour la première fois d'être réalisées sur le gène *Brachyury* (Yamada *et al.*, 2009).

Trichoplax adhaerens est actuellement le seul représentant du groupe des placozoaires (un seul genre, mais possiblement plusieurs espèces (Voigt et al., 2004)), découvert en 1883 dans un aquarium d'eau de mer. Les placozoaires sont des organismes marins, microscopiques, asymétriques et aplatis, dont le cycle de vie complet est toujours inconnu (Signorovitch et al., 2005) et sont constitués uniquement de quatre types de cellules somatiques (Schierwater, 2005 ; Blackstone, 2009) (Figure 9A). L'organisme se déplace grâce à des cils et aux déformations de son corps. Il se nourrit de débris organiques et d'eucaryotes unicellulaires en absorbant les produits de sa digestion extra-corporelle (Lecointre et Le Guyader, 2001). Depuis sa découverte, cet organisme souvent considéré comme le métazoaire le plus simple morphologiquement (il ne possède ni plan de symétrie, ni bouche, ni système nerveux, ni membrane basale, Figure 9B) a suscité de nombreuses interrogations. Les scientifiques ont d'abord pensé que les caractéristiques de son plan d'organisation pourraient représenter l'état ancestral des métazoaires (Syed et Schierwater, 2002); mais par la suite, les zoologistes et les biologistes de l'évolution délaissèrent ce modèle, et durant plus d'un demi-siècle, T. adherens passa pour une larve planula aberrante d'un Hydrozoaire (Ender et Schierwater, 2003). Récemment, cet organisme a été redécouvert en tant qu'espèce clé pour la compréhension de l'évolution précoce des métazoaires (Miller et Ball, 2008) et son génome a été entièrement séquencé (Srivastava et al., 2008). A cette occasion il fut même comparé à la pierre de Rosette de Champollion par Stephen Dellaporta, co-superviseur du projet de séquençage (ScienceDaily, 8 sept 2008)! Cependant, malgré l'obtention de cette grande quantité de données, sa position phylogénétique est toujours incertaine (cf. partie précédente). De plus, statuer sur le caractère ancestral ou dérivé de sa morphologie simple reste difficile (Miller et Ball, 2005, 2008 ; Schierwater et al., 2009b). Cependant, des études sur la composition du génome de T. adherens ainsi que sur les gènes du développement ont donné lieu à des résultats intéressants et parfois même inattendus,

Pathway	Type I novelty	Type II novelty	Type III novelty	
Integrin signating	Integrin-alpha; caveolin	Collagen; Integrin-ft Fak; Jun	Calpain	
Wnt signaling	Wnt; secreted frizzled related factors; frizzled; strabismus/van gogh	Dickkopf; arrow; dishevelled; axin		(
TGFB signaling	Dpp/BMP; activin; gremlin; chordin; follistatin; R-SMAD; I-SMAD; co-SMAD	Type I receptors: TGF(R1, BMPR1A; ATF/JunB; snoN	Tolloid/BMP1	Figure10 :Illustrationdurépertoiregénétique
Notch signaling	Numb; hairy/E(spl)	Notch		diversifié de
Ephrin signaling		Ephrin; Fak	Eph (receptor)	Nematostella vectensis. Sont
Insulin signaling	Insulin	Insulin receptor substrate; phosphoinositide-3-kinase, catalytic	Insulin receptor/IGF; phosphoinositide-3- kinase, dass 2	mentionnés 8 voies de signalisations et 7 processus
FGF signaling	FGF; Shc	Raf homolog serine,threonin e-protein kinase; Ras GTPase activating protein	FGFR; RAS protein activator; phospholipase Cy; phosphoinositide-3- kinase, class 2; protein kinase Cu	biologiques. Les nouveautés de type I correspondent à des protéines
Cytokine signaling	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor; SOCS; arrestin; guanine nucleotide binding protein γ; regulator of G- protein signaling; REL/NFKB; NFAT	Adenylate cyclase 5/6; STATS; ATF/Jun	CDC42 binding protein kinase	présentant aucune homologie avec des protéines de non
Process	Type I novelty	Type II novelty	Type III novelty	metazoaires. Les
Neurogenesis	Hes; Gan; Ephrin; netrin; semaphoring; dachsund; ski oncogene	Notch; NGFR; Dsh; An; CREB/ATF; neuralized	Neuropilin; Lhx; ephrin receptor	correspondent à des
Synaptic transmission	Nitric oxide synthase (neuronal) adapter protein; DOPA-β monoxygenase; calcium channel voltage-dependent β; syntrophin; synaptophysin; dystrophin; potassium large conductance calcium-	Cholinergic receptor, nicotinic; neurexin	K-voltage gated channel; discs large	l'association de nouveaux domaines et de domaines déjà
Extracellular matrix	activated channel, subfamily M β Netrin; dermatopontin; semaphorin; glypican; stereocilin	Collagen; spondin; Iaminin	Nidogen; stabilin; neuropilin; matrix metalloprotease; thrombospondin	présents chez les non métazoaires. Les nouveauté de type III
Cell junction	par-6	Tight junction protein	Voltana dependent	correspondent à des
Muscle contraction	Voltage-dependent calcium channel β, β-sarcoglycan, β-dystrobrevin	Cholinergic receptor, nicotinic nebulin; tropomyosin; calponin/transgelin	calcium channel c2/8 subunit; incsitol triphophate receptor; calcium activated potassium channel slowpoke	protéines résultant de l'association d'anciennes protéines et
Apoptosis	TNF5/10/11; Bd2; BOK; GULP; CRADD; caspase 8/10; growth arrest and DNA- damage-inducible; DNA fragmentation factor 40-kD subunit; interleukin enhancer-binding factor 3; FMR	Neuronal apoptosis inhibitory protein; CARD9/11	NGFR; SRGAP; calpain	d'anciens domaines (Putnam <i>et al.</i> , 2007).
Transcription factors	L3MBT; T-Box; Nuclear hormone receptor; SMAD; dachsund; gcm; NFAT; nuclear respiratory factor; SKI family; sprouty; AP-2; onecut; MAF-related	CBP/p300; ETO/MTG8/Nervy; groucho; Jun; Myt1; runt; STAT	Hairless; nuclear protein 95; LIM homeobox; CCAAT enhancer binding; aryl hydrocarbon receptor related	



Figure 11 : Les répertoires génétiques diversifiés de T. adhaerens et N. vectensis.

(A) Gènes impliqués dans les processus d'adhésion cellulaire et synaptique, et voies de signalisations chez *T. adhaerens* (Wnt et TGF-β). Sont mentionnées en vert les protéines présentes chez le placozoaire et en rouge celles qui y sont absentes (Srivastava *et al.*, 2008).
(B) Liste des gènes à homéoboîte présents chez *T. adhaerens* et *N. vectensis* (Schierwater *et al.*, 2008).

comme la présence d'un gène *Hox* dont le territoire d'expression délimite une frontière entre deux types cellulaires (Schierwater et Kuhn, 1998 ; Martinelli et Spring, 2004 ; Hadrys *et al.*, 2005 ; Monteiro *et al.*, 2006 ; Schierwater *et al.*, 2008). Aucune étude fonctionnelle sur cet organisme n'a été réalisée à l'heure actuelle.

De manière générale, les données moléculaires obtenues récemment chez les non-bilatériens ont suscité beaucoup d'étonnement et ont bousculé l'idée encore répandue selon laquelle un organisme présentant une simplicité morphologique évidente devrait posséder un ensemble de gènes du développement également réduit (Ball et al., 2004). Or les résultats ponctuels (EST) obtenus chez les organismes basaux ces deux dernières décennies ainsi que l'étude de leurs génomes complets ces dernières années contredisent totalement cet a priori. Cette complexité génétique inattendue se présente à divers niveaux : en terme de nombre de gènes présents, mais également en nombre de familles de gènes présentes. Ainsi, l'analyse d'une collection d'EST obtenues chez le cnidaire Acropora millepora a révélé la présence d'un grand nombre de gènes homologues à ceux de vertébrés (et absents chez C. elegans et D. melanogaster), appartenant à des voies de signalisation majeures, des classes diverses de facteurs de transcriptions et des gènes de ménage (Kortschak et al., 2003 ; Technau et al., 2005). De même, la majorité des gènes de la superfamille Antennapedia (Hox et non-Hox) ainsi que des membres des voies de signalisation ont également été retrouvés chez l'anémone N. vectensis (Kamm et Schierwater, 2006; Ryan et al., 2006; Putnam et al., 2007) (Figure 10 et 11B) et l'hydre (Chourrout et al., 2006). Concernant le placozoaire T. adherens, l'étude de son génome a pareillement révélé la présence de nombreux gènes du développement de la superfamille ANTP et des voies de signalisation (Schierwater et al., 2008 ; Srivastava et al., 2008) (Figure 11A-B). Cette idée de simplicité des organismes non-bilatériens a pour origine divers concepts que nous avons hérité de nos contemporains tels que le concept de plan d'organisation mais également une vision du monde vivant basée sur sa comparaison avec l'homme (Manuel, 2007). En effet, une vision anthropocentrique du monde vivant persiste dans la définition et la nomenclature que nous mettons en place pour décrire les organismes qui nous entourent. Ces avancées spectaculaires et les études prépondérantes réalisées cette dernière décennie sur ces organismes non bilatériens ont prouvé sans conteste l'utilité de ces modèles.



#### **B.2.2**: Les éponges

#### Présentation générale du phylum des spongiaires ou Porifera

Les éponges sont des animaux aquatiques, essentiellement marins. On dénombre aujourd'hui près de 7000 espèces décrites, présentant une très grande diversité tant sur le plan morphologique qu'en ce qui concerne l'anatomie des adultes et des larves (Figure 12A) (Hooper et al., 2002; Manuel et al., 2003b). Cependant, toutes les éponges partagent une organisation très originale qui a permis de les regrouper au sein du phylum Porifera (Figure 12B). La caractéristique majeure de ce plan d'organisation est la présence d'un système aquifère constitué de chambres choanocytaires et d'un réseau plus ou moins complexe de canaux (Figure 12C). L'eau entre par des pores inhalants (ou ostioles) et circule dans des canaux dits inhalants, puis atteint les chambres choanocytaires, où elle est filtrée. Elle est ensuite collectée par des canaux dits exhalants qui se rejoignent en une ouverture plus large, l'oscule, par laquelle l'eau est évacuée (Hooper et al., 2002). Il existe divers types d'organisation du système aquifère mais les types asconoïde, syconoïde et leuconoïdes sont les plus courants (Boury-Esnault et Rützler, 1997) (Figure 12D). Les chambres choanocytaires sont tapissées de cellules filtrantes, les choanocytes. Ces cellules sont munies d'un flagelle situé au centre d'une collerette constituée de microvillosités. Le flagelle met en mouvement l'eau, tandis que la collerette agit comme un filtre à particules alimentaires. Du point de vue histologique, les éponges sont constituées de trois couches cellulaires: le choanoderme, le pinacoderme et le mésohyle. Le choanoderme (ensemble de choanocytes) constitue le revêtement des chambres choanocytaires alors que la surface de l'éponge ainsi que les canaux aquifères sont tapissés par le pinacoderme (ensemble de pinacocytes). Entre ces deux couches, le milieu intérieur est constitué par le mésohyle renfermant la matrice extra-cellulaire ainsi que de nombreuses cellules amœboïdes tels que les archæocytes (Figure 12B) (Boury-Esnault et Rützler, 1997). L'architecture d'une éponge est en général soutenue par un squelette organique constitué de spongine (Figure 13A) et/ou un squelette minéral constitué de spicules (de silice ou de calcaire), dont la forme et l'agencement ont servi et servent encore de base à la classification. Il existe néanmoins quelques exemples d'éponges qui ne contiennent pas de squelette (ni spongine, ni spicules) et à l'opposé, des spécimens à squelette fortement minéralisé.





Figure 13 : (A) Fibres de spongine (*Spongia arabica*) modifié d'après (Borchiellini *et al.*, 2004). (B) Exemple de spicules de demosponges à symétrie d'ordre un (*Lollipocladia tiburoni*) observés au MEB ; modifié d'après (Vacelet, 2008).



Figure 14 : (A) d'éponges Dessins calcaires (Ernst Haeckel, 1870). (B) Exemples de spicules d'éponges calcaires (Sycettusa *chilensis*); modifié d'après (Azevedo et 2009). al., (C) Exemples de spicules calcaires observés au MEB (Petrobiona massiliensis), photo J. Vacelet.







Figure 15 : (A) Dessins d'éponges hexactinellides et spicules (Ernst Haeckel). (B) Exemples de spicules d'hexactinellides à symétrie d'ordre six (*Heterochone calyx*, *Rhabdopectella tintinnus*, *Euplectella* sp.) observés au MEB, modifié d'après (Dohrmann *et al.*, 2008)



#### • Une phylogénie interne toujours incertaine

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, les relations phylogénétiques à la base de l'arbre des métazoaires sont encore très controversées. De même, les relations phylogénétiques au sein des éponges sont incertaines. Classiquement, les éponges formeraient un taxon (élevé au rang de phylum) constitué de trois classes définies à partir de la nature du squelette (Hooper *et al.*, 2002) : (i) les Demospongiae qui présentent le plus souvent des spicules de silice à symétrie de type un ou quatre et/ou de la spongine (Figures 13A et B), néanmoins, ce groupe connaît également des éponges sans squelette et des éponges à squelette calcifié (Hooper et van Soest, 2002) ; (ii) les Hexactinellida dont les spicules siliceux ont une symétrie d'ordre six (Figures 14 A et B) et (iii) les Calcarea qui renferment des spicules en calcite de un à quatre axes. (Figures 15 A et B) (Manuel *et al.*, 2002).

Cependant, diverses analyses moléculaires (basées essentiellement sur l'ADNr 18S et 28S) tendent à montrer que les éponges ne constitueraient plus un groupe monophylétique mais un assemblage paraphylétique de diverses lignées à la base de l'arbre des métazoaires (Zrzavy *et al.*, 1998 ; Borchiellini *et al.*, 2001 ; Manuel *et al.*, 2003a ; Borchiellini *et al.*, 2004 ; Mallatt *et al.*, 2009). Cette hypothèse de non-monophylie (paraphylie ou polyphylie) a également été retrouvée plus récemment suite à l'analyse de génomes mitochondriaux complets (Lavrov *et al.*, 2008 ; Wang et Lavrov, 2008), bien que le jeu de données utilisé soit incomplet (éponges calcaires absentes), à l'étude de sept gènes dits « de ménage » (Peterson et Butterfield, 2005 ; Sperling *et al.*, 2007 ; Peterson *et al.*, 2008 ; Sperling *et al.*, 2009) mais également à une analyse de phylogénomique (Hejnol *et al.*, 2009). Dans le cadre de l'hypothèse de paraphylie, il a été envisagé deux scénarios évolutifs :



proches des eumétazoaires que des autres éponges, modifié d'après (Sperling *et al.*, 2009).

(C) : Hypothèse de monophylie des éponges, modifié d'après (Philippe et al., 2009)

- (i) les éponges calcaires seraient plus proches des eumétazoaires qu'elles ne le sont des autres éponges (Borchiellini *et al.*, 2001 ; Manuel *et al.*, 2003a), bien qu'aucune synapomorphie morphologique ne soutienne le clade (calcaires + eumétazoaires) (Borchiellini, 2007) (Figure 16A).
- (ii) les Homoscleromorpha, longtemps classées dans les démosponges ont été plus récemment proposées comme une lignée à part entière (la 4<sup>e</sup>) potentiellement plus proche des eumétazoaires (groupe frère) qu'elles ne le sont des trois autres lignées d'éponges (Borchiellini *et al.*, 2004 ; Sperling *et al.*, 2007 ; Peterson *et al.*, 2008 ; Hejnol *et al.*, 2009 ; Sperling *et al.*, 2009) (Figure 16B). Les homoscléromorphes présentent des caractéristiques particulières ; le chapitre II de cette thèse leur sera entièrement consacré.

Cette hypothèse de paraphylie des éponges implique également que les caractéristiques du plan d'organisation « spongiaire » seraient plésiomorphes à l'échelle des métazoaires et donc que tous les eumétazoaires seraient issus d'un organisme ancestral présentant des caractéristiques de type « spongiaire » qui aurait été secondairement perdues. Selon cette hypothèse, l'ancêtre commun des métazoaires posséderait soit des choanocytes et un système aquifère, soit serait une larve d'éponge de type homoscléromorphe (Maldonado, 2004 ; Borchiellini, 2007 ; Nielsen, 2008).

Cette paraphylie favorise également l'hypothèse selon laquelle les choanocytes des éponges pourraient être homologues aux cellules à collerette des choanoflagellés, le groupe frère des métazoaires (King *et al.*, 2008 ; Nielsen, 2008). Cependant, certains auteurs estiment que les ressemblances entre ces cellules pourraient avoir été acquises par convergence. En effet, des détails ultrastructuraux des microvillosités et de l'organisation des microtubules du cytosquelette sont différents entre choanocytes et cellules de choanoflagellés. De plus, leurs propriétés fonctionnelles semblent également différer, les microvillosités des choanoflagellés étant contractiles, ce qui n'est pas le cas des choanocytes (Philippe *et al.*, 2009).

Cependant, cette hypothèse de paraphylie n'est pas retrouvée de façon unanime dans les analyses. Ainsi, il y a quelques mois, la première analyse de phylogénomique spécifiquement orientée pour résoudre la base de l'arbre (échantillonnage adéquat) a remis au goût du jour l'hypothèse traditionnelle de monophylie des éponges (Philippe *et al.*, 2009) (Figure 16C). Selon cette hypothèse, les éponges se subdiviseraient en deux clades



(Hexactinellida + Demospongiae) et (Calcarea + Homoscleromorpha) (Dohrmann *et al.*, 2008 ; Philippe *et al.*, 2009).

#### • Eponges et Evo-Dévo : un développement récent mais prometteur

La première étude en Evo-Dévo chez les éponges a été entreprise il y a une quinzaine d'années (Seimiya *et al.*, 1994). L'étude de l'éponge d'eau douce *Ephydatia fluviatilis* révéla la présence de gènes appartenant à la super-classe Antennapedia (ANTP). D'autres études, basées majoritairement sur la recherche des gènes de la super classe ANTP chez des démosponges (*Ephydatia muelleri, Suberites domuncula*) et des calcaires (*Sycon raphanus*), se sont succédées (Seimiya *et al.*, 1997 ; Richelle-Maurer *et al.*, 1998 ; Seimiya *et al.*, 1998 ; Richelle-Maurer et Van de Vyver, 1999 ; Manuel et Le Parco, 2000 ; Wiens *et al.*, 2003 ; Hill *et al.*, 2004 ; Manuel *et al.*, 2004 ; Jager *et al.*, 2006 ; Richelle-Maurer *et al.*, 2006), mais la recherche de ces gènes par PCR avec amorces dégénérées rendait la tâche peu aisée, du fait manifestement de la divergence assez importante des séquences cibles. Par la suite, l'acquisition des premières banques EST chez les éponges a permis un développement plus rapide de ces modèles. Les premières expériences d'hybridations *in situ* ont eu lieu chez une démosponge *Suberites domuncula* (Adell *et al.*, 2003a ; Adell *et al.*, 2003b ; Perovic *et al.*, 2003) puis plus récemment sur les larves d'*Amphimedon queenslandica* (Larroux *et al.*, 2006), suggérant une fonction de ces gènes dans des processus morphogénétiques.

En 2005, le séquençage du premier génome d'éponge débuta et la démosponge *Amphimedon queenslandica* fut choisie (Figure 17A) (Leys *et al.*, 2005). Au moment du séquençage, cette éponge, que l'on trouve principalement en Australie (Queensland), était encore non décrite et nommée de façon erronée *Reniera sp.* (Hooper et Van Soest, 2006). Bien que les données morphologiques et histologiques sur ce modèle soient un peu limitées, son cycle de vie est bien connu (Leys et Degnan, 2002) : elle est en reproduction toute l'année permettant l'obtention régulière de nombreux embryons et larves qui se trouvent dans des chambres d'incubation (Figures 17B et C). Ces caractéristiques facilitent les expériences d'hybridation *in situ* sur larves et embryons, ainsi que leur maintien et développement en aquarium (Degnan *et al.*, 2009a).

L'analyse de ce génome a révolutionné nos connaissances et théories sur la boîte à outils moléculaires de l'ancêtre commun des métazoaires, et, depuis son acquisition, les études sur



Figure 18: Les principaux modèles d'éponges développées actuellement autres qu'*Amphimedon queenslandica*(A): Oscarella carmela. (B): Oscarella lobularis. (C) Sycon ciliatum. (D): Sycon raphanus.
(E) Ephydatia sp. (F) Suberites domuncula.

cette démosponge se multiplient. Elles furent dans un premier temps focalisées sur les gènes ANTP (Larroux et al., 2006; Larroux et al., 2007; Fahey et al., 2008; Larroux et al., 2008; Degnan et al., 2009b). Puis, très vite, les voies de signalisation majeures furent recherchées et identifiées, attestant de la présence chez les éponges de la quasi-totalité des familles de gènes de développement présentes chez les eumétazoaires, bien que moins grandement diversifiées (Adamska et al., 2007; Gauthier et Degnan, 2008; Richards et al., 2008; Gazave et al., 2009 ; Richards et Degnan, 2009). L'étude de cette éponge a également révélé l'ancienneté de diverses familles de gènes ou micro-ARN (Simionato et al., 2007 ; Exposito et al., 2008 ; Grimson et al., 2008 ; Wheeler et al., 2009). En quelques années, les efforts de recherche sur cette éponge se sont intensifiés et A. queenslandica est souvent présentée comme LE modèle éponge. Cependant, il faut parfois nuancer des affirmations proposées par les auteurs de certaines de ces études. En effet, A. queenslandica, comme n'importe quel modèle, n'est pas représentatif de l'ensemble des éponges et encore moins de l'état ancestral des métazoaires et il faut se préserver d'une tendance néfaste à une interprétation excessive et spéculative des résultats. Par exemple, l'absence de certains gènes chez A. queenslandica pourraient être dérivée plutôt que primitive, c'est-à-dire résulter de pertes secondaires de gènes, propres à cette lignée (Peterson et Sperling, 2007).

Quelques autres modèles d'éponges sont actuellement (ou ont été) développés dans le monde : les éponges calcaires *Sycon (raphanus* et *ciliatum*), les démosponges *Ephydatia* spp, et *Suberites domuncula* ; les éponges homoscléromorphes *Oscarella (carmela* et *lobularis)* (Manuel et Le Parco, 2000 ; Manuel *et al.*, 2004 ; Jager *et al.*, 2006 ; Nichols *et al.*, 2006 ; Segawa *et al.*, 2006 ; Gazave *et al.*, 2008 ; Ereskovsky *et al.*, 2009 ; Lapebie *et al.*, 2009) (Figures 18). Cependant, le nombre d'études consacrées aux démosponges demeure nettement supérieur à celles utilisant des modèles appartenant aux 3 autres lignées (Figure 19).

*Oscarella lobularis* étant le modèle développé au sein de notre équipe, le chapitre II lui sera spécialement consacré.

Parallèlement à cela, il est à noter que pour l'instant, les études sur les éponges sont essentiellement basées sur l'interprétation de patrons d'expressions, en partant du pré-requis qu'un gène est impliqué dans la formation de la structure dans laquelle il est exprimé. Or, seul des expériences fonctionnelles pourront prouver la fonction d'un gène/d'un circuit génétique et sa possible conservation de fonction à l'échelle des métazoaires. Actuellement, seules deux

Nombreuses familles de facteurs de transcription: ANTP, Pou, Prd, Sox, Fox, bHLH	Gazave et al., 2008         Fahey et al., 2008         Larroux et al., 2008         Larroux et al., 2007         Simionato et al., 2007         Larroux et al., 2006         Richelle-Maurer et al., 2006         Manuel et al., 2000
6 voies de signalisation majeures :Notch, Wnt, Hedgehog, TGF-β, RTK, Jak/stat	Gazave et al., 2009         Lapébie et al., 2009         Richards et al., 2008         Gauthier et al., 2008         Adamska et al., 2007a/b         Adell et al., 2007         Nichols et al., 2006         Adell et al., 2003

Figure 19 : Tableau résumant la majorité des études d'évo-dévo chez les éponges et la sous-représentativité des modèles non-démosponges. En jaune, les études portant sur les démosponges, en vert, l'étude portant sur les calcaires et en rose les études sur les homoscléromorphes. NB : Il n'y a aucune étude dans ce domaine sur les héxactinellides.

études « fonctionnelles » (parfois indirectes) ont été réalisées chez les éponges *via* l'utilisation d'inhibiteurs chimiques ou d'injection de gène d'éponge chez la drosophile et le xénope (Richards *et al.*, 2008 ; Lapebie *et al.*, 2009). Des essais d'injections ou d'électroporation d'ARN messager ou de morpholinos sont actuellement en cours chez *Sycon ciliatum* (communication personnelle : Maja Adamska).

La prochaine étape décisive pour l'évolution de tous ces modèles est donc la maîtrise d'au moins une technique permettant une approche fonctionnelle.

# CHAPITRE II

L'éponge homoscléromorphe *Oscarella lobularis* : un modèle prometteur en Evo-Devo des métazoaires basaux

### A] Introduction

Nous avons montré précédement, l'intérêt des éponges en évo-dévo et comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'établissement d'un nouveau modèle de recherche en évo-dévo requiert une bonne connaissance de cette espèce dans différents domaines. Ce chapitre regroupe les différentes études auxquelles j'ai activement participé lors de ma thèse afin de développer au mieux un nouveau modèle. Le choix de ce modèle doit être dicté par différents critères : facilité d'obtention, disponibilité pour la communauté scientifique internationale, capacité de maintien de l'espèce en laboratoire, facilité d'obtention des embryons/larves ... L'éponge prépondérante Amphimedon queenslandica (Leys et al., 2005) présente l'avantage non négligeable d'être en reproduction toute l'année et d'incuber des embryons et larves de grandes tailles, facilitant ainsi leur manipulation. Cependant, son histologie et sa cytologie sont encore peu connues et l'interprétation des résultats d'hybridations in situ en est parfois gênée (voir remarques dans le chapitre VI) (Sakarya et al., 2007 ; Richards et al., 2008). Pour les éponges à spicules (Amphimedon, Sycon ...), les expériences d'hybridations in situ sont plus difficiles que pour celles sans spicules (Oscarella). Cependant, ces dernières étant en reproduction une seule fois dans l'année, les expériences sur les embryons/larves sont limitées. Les processus morphogénètiques sur l'adulte sont alors, plus faciles à étudier. De plus, la majorité de ces modèles ne vivent que dans une région spécifique, interdisant de fait leur accès à un grand nombre d'équipes. Seul un modèle d'éponge d'eau douce (ex : Ephydatia), se maintenant facilement en aquarium profiterait à l'ensemble de la communauté. Ainsi, parmi tous les modèles développés actuellement, aucun n'est parfait. Ils présentent tous des avantages mais également un certains nombre de limites. Seule une stratégie de multiplication des modèles pourra palier à ces problèmes et c'est pourquoi, nous avons décidé dans l'équipe de Carole Borchiellini de développer un nouveau modèle.

Notre équipe a grandement participé à l'établissement des relations phylogénétiques internes au sein des éponges *via* des analyses de phylogénies moléculaires associées aux connaissances morphologiques des membres de l'équipe (Borchiellini *et al.*, 1998 ; Borchiellini *et al.*, 2001 ; Manuel *et al.*, 2003a ; Borchiellini *et al.*, 2004) (Annexe I). Ces travaux ont notamment permis la distinction de la 4<sup>e</sup> lignée d'éponge, les homoscléromorphes, classiquement incluses au sein des démosponges. Ces éponges possèdent des caractéristiques morphologiques uniques chez les éponges : une membrane basale comprenant du collagène de type IV, des jonctions cellulaires spécialisées et par conséquent des couches cellulaires pouvant être assimilés à de vrais épithéliums (Ereskovsky *et al.*, 2009 ; Leys *et al.*, 2009). Ces caractères morphologiques sont à l'heure actuelle considérés comme étant des synapomorphies des eumétazoaires. La présence de ces spécificités morphologiques, associées à une possible position phylogénétique proche des eumétazoaires (suivant l'hypothèse de la paraphylie des spongiaires, voir chapitre I) font de cette lignée un groupe particulièrement intéressant à étudier. Lorsque l'équipe a souhaité développer un modèle éponge en évo-dévo, ce sont ces principaux éléments qui ont guidé le choix vers ce groupe. De plus, la majorité des modèles éponges développés appartiennent aux démosponges et il semblait judicieux de développer un modèle d'une lignée distincte. Le choix de l'espèce *Oscarella lobularis* a également été justifié par sa disponibilité dans la région et par sa bonne description d'un point de vue cytologique, morpho-anatomique et embryologique.

Afin de développer de façon raisonnée notre modèle homoscléromorphe, nous avons entrepris diverses études parallèles à nos travaux principaux d'évo-dévo. Premièrement, les connaissances précédemment acquises en embryologie, cytologie, morpho-anatomie et sur les morphogénèses chez les adultes, ont été synthétisées afin de faire connaître notre modèle par la communauté internationale (partie B1 de ce chapitre). L'accès aux embryons et larves chez *Oscarella lobularis* étant assez limité, de part le fait que la reproduction sexuée chez cette espèce n'intervient qu'une fois par an, une connaissance approfondie de son cycle de vie s'est révélée indispensable afin d'identifier au mieux les périodes de récolte des échantillons gravides. C'est pourquoi, une étude écologique sur son cycle de vie et son effort reproducteur a aussi été initiée lors de ma thèse et fera l'objet de la partie B.2. Il s'est avéré également nécessaire de bien connaître la phylogénie interne de ce groupe et la position de notre modèle. C'est pourquoi, nous avons entrepris un travail de phylogénie moléculaire sur cette lignée (partie B.3). Par la suite, des expériences de maintien et de développement des éponges et des larves en aquariums ont été réalisées et seront également présentées dans ce chapitre.

## **B**] Caractéristiques d'Oscarella lobularis

### B.1 : Généralités sur notre animal « favori »

#### **B.1.1 : Présentation de l'article**

De nombreuses irrésolutions perdurent quant aux relations phylogénétiques au sein des éponges et entre les éponges et les autres taxons de métazoaires basaux (Borchiellini et al., 2004 ; Sperling et al., 2007 ; Dohrmann et al., 2008 ; Dunn et al., 2008 ; Srivastava et al., 2008 ; Philippe et al., 2009). Neanmoins, les éponges sont des organismes dont les études, devenues incontournables, ont pour objectifs de répondre ou du moins de donner des informations sur des questions majeures toujours irrésolues telles que l'origine des axes de polarité (bien que la majorité des adultes ne présentent pas de polarité évidente, les larves d'éponges sont polarisées), des épithéliums (à l'exception des homoscléromorphes, les éponges sont considérées comme ne présentant pas de vrai épithélium), du système nerveux (les éponges ne possèdent pas de cellules nerveuses mais présentent des réponses à des stimuli) etc...(Adamska et al., 2007; Richards et al., 2008; Lapebie et al., 2009). Notre équipe a choisi de se focaliser sur un modèle éponge appartenant à la 4<sup>e</sup> lignée d'éponge, jamais étudiée dans une perspective évo-dévo jusqu'à lors : les homoscléromorphes. Nous avons estimé que travailler sur ce groupe phylogénétiquement distant du modèle majeur démosponge actuellement développé (Amphimedon queenlandica (Leys et al., 2005)) était judicieux, et ce, dans une démarche comparative au sein des éponges et à plus large échelle, des métazoaires (Collins, 2005).

L'anatomie des homoscléromorphes est assez simple, elles sont caractérisées par la présence d'un choanoderme (avec des grandes chambres), d'un squelette siliceux non-organisé (s'il est présent) et d'un pinacoderme flagellé. Entre les deux feuillets (pinacoderme et choanoderme) se trouve le mésohyle. Les particularités de ce groupe d'éponge sont la présence de couches cellulaires pouvant être assimilées à de vrais épithéliums (Nielsen, 2008 ; Lapebie *et al.*, 2009), ainsi qu'une membrane basale composée de collagène de type IV (Boute *et al.*, 1996) et des jonctions cellulaires spécialisées (Ereskovsky, 2006). Ces caractères qui sont considérés comme des synapomorphies des eumétazoaires ont en grande partie orienté le

choix de notre modèle d'étude au sein de cette lignée afin de pouvoir étudier l'origine des épithéliums chez les métazoaires. Parmi les homoscléromorphes, nous avons choisi comme modèle l'espèce type du genre Oscarella : Oscarella lobularis. Ce genre ne possède pas de spicules, ce qui représente un avantage pour les techniques d'hybridations in situ. Les particularités écologiques et les empreintes biochimiques de cette espèce sont bien connues et/ou en cours d'étude (Thèse de Julijana Ivanisevic). Les reproductions asexuée et sexuée d'Oscarella lobularis ont été étudiées en détails (Ereskovsky et Boury-Esnault, 2002 ; Ereskovsky, 2006). Le développement embryonnaire d'O. lobularis, bien décrit, aboutit à une larve dite cinctoblastula présentant une polarité antéropostérieure prononcée (Boury-Esnault et al., 2003 ; Ereskovsky et al., 2007). La présence de cette polarité très nette chez la larve fait de cette espèce un modèle intéressant pour étudier la mise en place de la polarité chez les métazoaires. Ses particularités embryologiques, morphologiques et phylogénétiques et les connaissances variées acquises sur cette espèce d'homoscléromorphe (encore appelée épithéliosponges (Ereskovsky et Dondua, 2006)) font d'elle un bon candidat pour devenir un modèle en évo-dévo des métazoaires basaux. Les premiers résultats prometteurs font espérer qu'elle le deviendra effectivement (cf. chapitres suivants).

Cet article avait pour but de faire connaître et de partager les connaissances diverses et détaillées accumulées au sein de notre laboratoire sur le modèle *Oscarella lobularis* afin de le promouvoir au sein de la communauté scientifique.

Ce travail dont je suis co-auteur a fait l'objet d'un article de revue paru dans BioEssays dans la catégorie «My favorite animal» en 2009.

# B.1.2 : Article 1: The Homoscleromorph sponge *Oscarella lobularis*, a promising sponge model in evolutionary and developmental biology

## The Homoscleromorph sponge *Oscarella lobularis*, a promising sponge model in evolutionary and developmental biology

Model sponge Oscarella lobularis

Alexander V. Ereskovsky,<sup>1,2\*</sup> Carole Borchiellini,<sup>1</sup> Eve Gazave,<sup>1</sup> Julijana Ivanisevic,<sup>1,3</sup> Pascal Lapébie,<sup>1</sup> Thierry Perez,<sup>1</sup> Emmanuelle Renard,<sup>1</sup> and Jean Vacelet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre d'Océanologie de Marseille, Station marine d'Endoume, Aix-Marseille Université - CNRS UMR 6540-DIMAR, rue de la Batterie des Lions, Marseille, France

<sup>2</sup>Department of Embryology, Faculty of Biology and Soils, Saint-Petersburg State University, Universitetskaja nab. 7/9, St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup>Faculté de Sciences, Université de Nice Sophia-Antipolis – CNRS UMR 6001 LCMBA, Parc Valrose, Nice, France

Sponges branch basally in the metazoan phylogenetic tree and are believed to be composed of four distinct lineages with still uncertain relationships. Indeed, some molecular studies propose that Homoscleromorpha may be a fourth Sponge lineage, distinct from Demospongiae in which they were traditionally classified. They harbour many features that distinguish them from other sponges and are more evocative of those of the eumetazoans. They are notably the only sponges to possess a basement membrane with collagen IV and specialized celljunctions, thus possessing true epithelia. Among Homoscleromorphs, we have chosen Oscarella lobularis as a model species. This common and easily accessible sponge is characterized by relatively simple histology and cell composition, absence of skeleton, and strongly pronounced epithelial structure. In this review, we explore the specific features that make O. lobularis a promising homoscleromorph sponge model for evolutionary and developmental researches.

**Keywords:** development; evolution; Homoscleromorpha; model species; Porifera; sponges

#### Why sponges?

One of the major questions in the evolution of animals is the transition from unicellular to multicellular organization, which resulted in the emergence of Metazoa through a hypothetical Urmetazoa.<sup>(1,2)</sup> Sponges are filter-feeders devoid of organs

\*Correspondence to: A. V. Ereskovsky, Centre d'Océanologie de Marseille, Station marine d'Endoume, Aix-Marseille Université - CNRS UMR 6540-DIMAR, rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille, France. E-mail: aereskovsky@hotmail.com and specialized tissue; they have no nervous system, no digestive cavity. Their relatively simple body plan and the resemblance of their fundamental cell type, the choanocyte, to the choanoflagellates, suggested to some zoologists of the end of the 19th century that they were the first multicellular animals. The others considered a sponge as a colony of unicellular organisms only with loose, labile cell differentiation,<sup>(3)</sup> but not as a multicellular animal. This guestion has now been clearly settled, and the inclusion of sponges in the Metazoan clade appears without doubt<sup>(4-8)</sup> (Fig. 1A). However, the phylogenetic status of sponges is not so obvious. Traditionally, sponges are considered as monophyletic and divided in three lineages: Demospongiae, Hexactinellida and Calcispongiae.<sup>(9)</sup> However, monophyly of sponges has been recently challenged by number of molecular studies suggesting a paraphyletic arrangement of Porifera at the basis of a metazoan tree (Fig. 1).<sup>(10–13)</sup> In addition, Homoscleromorpha have been proposed as a fourth Sponge lineage phylogenetically distinct from Demospongiae in which they were traditionally classified (Fig. 1B).<sup>(11,14-16)</sup> Nevertheless, phylogenies based on different molecular datasets testing the relationships between these sponge lineages on one hand and their relation to non-sponge (eumetazoan) taxa (Ctenophora, Placozoa, Cnidaria and Bilateria) on the other hand, have provided conflicting results<sup>(7,10–12,15,17–21)</sup> and thus do not permit an unambiguous resolution for these questions. However, sponges still remain, as basal lineages, key organisms for unraveling early metazoan evolution, as illustrated by the growing interest for sponges (and more largely for 'non-bilaterian' animals) in the evolutionary and developmental (Evo-devo) field over the last 5 years.<sup>(22-31)</sup>

Evo-devo is a domain of research that aims at understanding the evolution of developmental processes and how

BioEssays 31:89-97, © 2009 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim



**Figure 1.** Phylogenetic relationships among sponges and eumetazoan taxa. (A) Classical view of metazoan evolution scenario: sponges are monophyletic and sister group of Eumetazoa. (B) New phylogenetic hypothesis based on DNAr 18S data according Borchiellini *et al.* 2001, 2004.<sup>(10,14)</sup> In this new scenario sponges constitutes four independent lineages at the basis of the tree.

these developmental changes can explain body plan evolution. One of the challenges of evo-devo is to understand how novelties emerged in evolution. Concerning animal evolution, the current hot topics concern the origins and morphogenesis of polarity axis, 'true' epithelial tissues, nervous system, digestive cavity *etc* Sponges, despite their morphological simplicity, harbour most of the families of regulatory developmental genes previously identified as actors in bilaterian models development.<sup>(23,24,26,27,31-33)</sup>

Genetic and expression data remain scarce for sponges. Results were mainly obtained from the study of one lineage— Demospongiae, more precisely *Amphimedon queenslandica*, the only sponge species for which the full genome is available.<sup>(23,24,26,27,29,30,32,34)</sup> These data gave rise to captivating hypotheses. Nevertheless, the lack of sufficient knowledge of the genes' functions and of their expression diversity in all sponge lineages prompted an occasional over interpretation of their evolutionary implications. Sponges display a huge diversity of growth forms and developmental strategies. Only a comparative approach is suitable to bear out the hypothesis made from *Amphimedon* data. There is, thus, a crucial need to develop new model organisms covering a broader phylogenetic range.<sup>(35)</sup>

One must keep in mind that the multiplication of models in an evo-devo approach is not at all a weakness but a powerful tool for 'reconstructing' the Urmetazoan genetic toolkit. Indeed, the presently abundant background on Bilateria evo-devo must be a lesson to us in the way that an a priori chosen model can a posteriori appear to possess very derived features, and that a single model cannot be considered as representative of its taxon.<sup>(36–39)</sup>



Figure 2. O. lobularis in vivo and in situ. (A) O. lobularis (OL) in typical biocoenosis. (B) Photographs of O. lobularis. L, lobes; O, osculum.

For this reason, our group chose to focus on another promising sponge model—*Oscarella lobularis* (Fig. 2) which belongs to a clade distant from the Demospongiae, and for which many data are presently available in the various fields of taxonomy, ecology, biochemistry, morphology, cytology and development. *O. lobularis*, thus could provide a suitable model, in a comparative context within sponges, for inferring the ancestral states from which the living animal phyla were derived.

# Why choose a Homoscleromorpha species?

Among the approximately 8,000 sponge species described to date,<sup>(9)</sup> we have chosen a representative of a small group, the Homoscleromorpha, which could provide, as emphasized before, a valuable comparison with the distantly related Demospongiae models such as *Amphimedon*.

The anatomy of Homoscleromorpha is limited to what some authors imagined to represent a 'minimum functional sponge.'<sup>(40)</sup> with a choanoderm (surface lined by choanocytes) composed of large choanocyte chambers, no cortex (Fig. 3A), and a non-organized skeleton made of siliceous spicules of a peculiar type (calthrops and its derivatives through reduction: diods and triods) that may even be absent. The thin, unspecialized ectosome and aquiferous system canals are lined by a regular layer of pinacocytes (pinacoderm), which is composed of relatively flat, uniflagellated cells (Figs. 3B, C). Between the choanoderm and pinacoderm epithelia a mesohyl layer contains several types of symbiotic bacteria and a few types of scattered cells, including cells with inclusions called vacuolar cells (Figs. 3G, H), and rare amoeboid cells called archaeocytes.

Another interest of Homoscleromorpha is that they are the only sponge lineage in which cell layers, both in larvae and adults, are very similar to those of eumetazoans and can be considered as a true epithelium. They possess a basement membrane including collagen IV fibrils (Figs. 3C, D)<sup>(44–46)</sup> and the pinacocytes and larval cells are connected by



Figure 3. Histology and ultrastructure of O. lobularis. (A) Semi-thin section through the sponge body (anatomy). CC, choanocyte chambers; Os, ostia. Scale bar: 10 µm. (B) SEM micrograph of external surface with flagellated exopinacoderm and ostia. Os, ostia. Scale bar: 20 µm. (C) TEM micrograph of flagellated endopinacocyte with the basement membrane. F, flagellum; BM, basement membrane. Scale bar: 2 µm. (D) TEM micrograph of basement membrane under the choanocytes. BM, basement membrane. Scale bar: 1 µm. (E): TEM micrograph of cell junctions (zonula adhaerens) between the ciliated cells of cinctoblastula larva (arrow). Scale bar: 2.5 µm. (F) TEM micrograph of cell junctions (zonula adhaerens) between the endopinacocytes (arrow). Scale bar: 3 µm. (G) View of vacuolar cell type I (TEM). N, nucleus; V, vacuole. Scale bar: 2 µm. (H) View of vacuolar cell type II (TEM). N, nucleus; V, vacuole. Scale bar: 2 µm. (I) Chromatogramme (SPE-HPLC-ELSD) of crude extracts of O. lobularis (red line) and O. tuberculata (blue line). The extracts of both species contain the fatty acid C24:2 (specific for the Oscarella genus) as a major compound. A large number of minor compounds are also shared. Encircled compounds are specific to each species. HPLC conditions: Standard gradient from CH3CN/H2O/HCOOH 10:90:0.1 to CH3CN/H2O/HCOOH 100:0:0.1, after Ivanisevic et al. 2007.(64)

specialized cell junctions, an unusual feature in sponges (Figs. 3E, F).  $^{\rm (47,48)}$ 

These characteristics probably explain that Homoscleromorpha exhibit a true epithelial morphogenesis–morphogenetic movements of cells united with their neighbours in a layer.<sup>(49)</sup> Epithelial folding is one of the basic morphogenetic processes reiterated throughout embryonic development in Eumetazoa. Interactions between epithelial cells and the extracellular matrix play a fundamental role in this morphogenesis.<sup>(50)</sup> In Homoscleromorpha, this process is observed during the egg's follicle formation,<sup>(51)</sup> during the metamorphosis in a rhagon (earliest developmental stage with a functional aquiferous system),<sup>(52)</sup> during the sponge growth starting as formation of projections of the exopinacoderm,<sup>(53)</sup> during asexual reproduction by budding,<sup>(47)</sup> during ostia formation and reparative regeneration (Ereskovsky *et al.*, in preparation).

Epithelial morphogenesis is quite rare in other sponge clades. In *Halisarca* (Demospongiae) invagination was described during disphaerula larva development and epithelization of larval posterior pole during metamorphosis.<sup>(54,55)</sup> In *Sycon* sp. (Calcaronea), stomoblastula excurvation,<sup>(56)</sup> invagination of larval anterior pole and epithelization of larval posterior pole during metamorphosis were described.<sup>(57)</sup>

#### Selection of O. lobularis

Homoscleromorpha consists of a single family Plakinidae with seven genera, including 77 species. Our favourite animal, *O. lobularis* (Schmidt, 1862) (Fig. 2), belongs to the genus which is characterized by the absence of skeleton, a great advantage for techniques such as *in situ* hybridization (ISH) on adults or dissociation-re-aggregation experiments.

#### A good taxonomic knowledge renders determination quite easy

The absence of a skeleton, the main morphological character for sponge taxonomy, explains the very complicated history of the species status of *O. lobularis*. It was considered for a long time as the only species of the genus *Oscarella*, displaying different consistency and colour morphotypes.<sup>(58)</sup> In fact, *Oscarella* appears as a good example of a single 'cosmopolitan' sponge species which turned out to be a highly diversified complex of species. At the present time, 13 species are listed in the World Data Base (http://www.marinespecies.org/porifera/index.php), including six Mediterranean species.<sup>(41,59)</sup> All these species can be distinguished by a careful examination of field, histological, cytological and biochemical characters. Since a clear discrimination of our model is needed for the benefit of the international scientific community and in the interests of the repeatability of results, our team is at present studying the relationships within the Oscarella genus by combining various characters including subtle histological, cytological and biochemical ones, which, combined with molecular analysis, may help in resolving the phylogeny of this sponge group.

#### Oscarella ecology and availability for experimental research

Sponges of the genus Oscarella only grow on rocky bottoms. In the Mediterranean, which exhibits a high diversity of homoscleromorph sponges. Oscarella species are dwellers in sciaphilic hard substratum communities, such as the coralligenous, semi-dark and dark submarine caves, and are found from the Gibraltar Strait to the Eastern Mediterranean. They are mainly located in shallow waters from 4 to 35 m, making the sampling as well as in situ monitoring easy. O. lobularis is one of the most common and abundant homoscleromorphs in the Mediterranean, conditioning specific facies in some places. As other species of the same genus, O. lobularis seems to be a strong competitor for space, overgrowing massive sponges, sea fans and bryozoans (Fig. 2A). This strong, out-competing ability may be due to a particularly efficient secondary metabolism, and the biochemical defence it confers. This hypothesis is also supported by the absence of a well-known predator or epibiotic organisms.

#### Contribution of biochemical fingerprints in understanding Homoscleromorpha relationships

The biochemical characteristics of several homoscleromorph sponges have been described by several authors, (60) but most of these studies have been focused on species or genera offering the best bioactivity and potential value for the biomedical field. The first chemical analyses of O. lobularis were probably performed on misidentified individuals of at least two distinct species, O. lobularis and O. tuberculata. (60-63) Because we believe that secondary metabolites can be useful complementary taxonomical markers, our team has recently developed a 'chemical fingerprint approach' that will allow rapid assessment of the chemical diversity and clear discrimination of Homoscleromorpha species. In general, all analysed Homoscleromorpha species show a high level of expression and diversity of apolar metabolites. The chemical analysis performed on two sibling species, O. tuberculata and O. lobularis clearly demonstrates distinct chemical signatures (Fig. 3I): some compounds are common to both species (and possibly to the genus) while others are species-specific.<sup>(64)</sup> These results give a classification of the group quite congruent with those obtained with traditional characterization. The chemical fingerprint approach is presently applied not only to Oscarella, but also to all Mediterranean homoscleromorphs in order to contribute to a phylogenetic interpretation.

#### Good knowledge of its reproduction and development: some specific features

Sexual and asexual reproduction and development of several *Oscarella* were studied in details. *O. lobularis* is ovoviviparous (Fig. 4A) with various reproductive strategies: most individuals are gonochoric, but some are hermaphroditic.

Spermatogenesis proceeds inside of spermatic cysts (Fig. 4B), formed through choanocyte chamber transdifferentiation.<sup>(65)</sup> Spermatogonia derive directly from choanocytes (Fig. 4C).<sup>(65,66)</sup> Spermatogenesis is asynchronous and there is a gradient in cell differentiation along the spermatic cysts, as in eumetazoans, whereas in Demospongiae spermatogenesis is synchronous in a cyst.<sup>(67)</sup> As in eumetazoans, the mature spermatozoa harbour an acrosome,<sup>(65,66)</sup> a feature also observed in few Demospongiae.<sup>(67,68)</sup>

The mature egg is isolecithal and polylecithal. One of the most remarkable characteristics of *Oscarella* oogenesis is the synthesis of yolk due to its own metabolism,<sup>(69)</sup> as it is in eumetazoans, whereas in the other sponges with polylecithal eggs, vitellogenesis is accompanied by phagocytosis of somatic cells or/and bacteria.

The embryonic development of Homoscleromorpha has been described as a special cinctoblastular type on the basis of its differences from the development of other sponges.<sup>(70)</sup> Cleavage in O. lobularis is holoblastic, equal, asynchronous and results in a solid apolar morula (stereoblastula) (Fig. 4D).<sup>(51)</sup> A coeloblastula with a large central cavity is formed by means of centrifugal migration of cells from the centre to the periphery of the morula (Fig. 4E). This embryonic morphogenesis is unique within sponges and Metazoa and has been termed multipolar egression.<sup>(51)</sup> The differentiation and proliferation of cells in the coeloblastula lead to the formation of a cinctoblastula larva with well pronounced anterio-posterior polarity (Figs. 4F, G). The columnar ciliated cells of the larval epithelium are closely linked by zonula adhaerens junctions (Fig. 3E). (48,52) The extracellular matrix forms a basement membrane immediately below the epithelial cells of larva. Thus, the larval epithelium of homoscleromorphs is very similar to the eumetazoan columnar epithelium.(48)

The metamorphosis occurs after 12–36 hours of larval swimming. The larva attaches to substrate by the anterior pole, its anterio-posterior axis corresponding to the basal-apical axis of the adult sponge.<sup>(52)</sup> The presence of an intranuclear crystalloid in posterior-lateral larval cells<sup>(48)</sup> is a natural marker that allows monitoring the fate of cells during metamorphosis, a highly disputable issue in sponge embryology. In all sponge species studied so far, metamorphosis is accompanied by a major disorganization of the external layer of larval ciliated cells, and the formation of pinacoderm and choanoderm occurs by a new association of



**Figure 4.** Development of *O. lobularis*. (A) Internal part of *O. lobularis in vivo* with the embryos. E, embryos. Scale bar: 250 μm. (B) Semi-thin section through spermatocysts. S, spermatocysts. Scale bar: 10 μm. (C) SEM micrograph of freeze-fracture through spermatocyst—evidence of choanocyte origin of male sexual cells. Sg, spermatogonia; Sp1, spermatocyte 1. Scale bar: 1.25 μm. (D) SEM micrograph of morula (stereoblastula). B, blastomere; Fo, follicle; M, maternal vacuolar cells. Scale bar: Scale bar: 40 μm. (E) Semi-thin section through the morulae during morphogenesis by multipolar egression—two stages. E, embryo; Fo, follicle. Scale bar: 60 μm. (F) SEM micrograph of a longitudinal section through a released, free-swimming cinctoblastula. Scale bar: 40 μm. (G) Diagram of cinctoblastula; after Boury-Esnault *et al.* 2003.<sup>(48)</sup> (a) Free-swimming larva. (b) Flagellated cell of anterior pole. (c) Flagellated cell of posterior pole. (d) Flagellated cell of posterior pole. Ap, anterior pole; Ba, bacteria, NC, non-flagellated cells, Pp, posterior pole. (H) Diagram of the different paths of formation of the rhagon during the metamorphosis of *O. lobularis* larvae, after Ereskovsky *et al.* 2007.<sup>(52)</sup> a: Cinctoblastula. b–b<sup>2</sup>: Basal invagination of anterior pole larval ciliated epithelium. c–c<sup>3</sup>: Extension and folding up of lateral sides of larval ciliated epithelium. d: Young sponge, rhagon. AL, antero-lateral cells; AP, anterior pole cells; If, internal folds of post-larva epithelium; PL, postero-lateral cells with intranuclear paracrystalline inclusions; PP, posterior pole cells. (I) Semi-thin section of floating bud of *O. lobularis*. CC, choanocyte chambers; In, internal cavity. Scale bar: 200 μm.

separate cells.<sup>(68)</sup> In contrast, in *Oscarella*, the formation of adult epitheliums, pinacoderm and choanoderm during metamorphosis occurs through the trans-differentiation of the larval epithelium (Fig. 4H).

The fate of larval cells during metamorphosis depends on their position in the post-larva (Fig. 4H: b–b<sup>2</sup>, c–c<sup>3</sup>).<sup>(52,71)</sup> Larval epithelium forms invaginations and evaginations accompanied by ingression of some cells.<sup>(52)</sup> Vertical transmission of symbionts from embryo to juvenile sponges has been also confirmed by our studies.<sup>(48,51)</sup>

Asexual reproduction in *Oscarella* occurs via budding that finished from 2 to 4 days (Fig. 4I).<sup>(47)</sup> The bud attached to the substrate has a syconoid-like organization similar to the rhagon developing after larva metamorphosis. The bud development in *Oscarella* differs from that of other sponges. It does not involve migration of cells from the mesohyl and their integration into the forming bud, but is based on epithelial morphogenesis by evagination. Similar morphogenesis is characteristic of palleal, stolonial and vascular budding in Ascidiacea<sup>(72)</sup> and is also well known in Cnidaria.<sup>(73)</sup>

#### Interest of O. lobularis as a promising sponge model in Evo–Devo compared to other models, and first encouraging results

We chose *O. lobularis* to study genetic mechanisms involved in morphogenetic processes because of its clear systematic description, its availability, its well-described histology, ultrastructure and development. Furthermore, as representative of Homoscleromorpha, it displays unique eumetazoan-like features absent in other sponges and phylogenetically may constitute an independent lineage distant from demosponge models (*A. queenslandica, Ephydatia* and *Suberites domuncula*).

In O. lobularis, degenerated PCR approach and a collection of 2000 EST resulted in the characterization of various genes of the Antennapedia (ANTP) class of homeobox genes. This class of genes is generally important for various developmental processes in Eumetazoa and is supposed to have played an early role in bauplan evolution. (23,74,75) The various families of ANTP genes, distributed into four subclasses (Hox, Parahox, EHGbox and NKL), (23) are found in the three major clades of Bilateria (deuterostomes, lophotrochozoans and ecdysozoans) and with a few exceptions they are also present in cnidarian genomes. (76-78) All previously characterized sponge ANTP homeobox genes belong to the NKL subclass.<sup>(23)</sup> A comparison of NK-related genes present in the genome of the demosponge A. queenslandica with their orthologues in other metazoans, led Larroux et al. (23) to propose that the last common ancestor of Metazoa probably possessed only six or seven NK-related genes (with reservation due to possible secondary loss in this species).<sup>(74)</sup> Among them at least five (NK5-7, Tlx, Hex, Msx and NK2-4) might have composed a hypothetic 'protoNK' cluster.<sup>(23)</sup> Nevertheless, expression data remain scarce and almost nothing is known concerning their role in sponge development. Thus, we focused on the expression characterization by ISH of some of them.(31)

Five partial homeobox gene fragments were isolated from five homoscleromorph species (*O. lobularis*, *O. imperialis*, *Pseudocorticium jarrei*, *Plakina jani* and *Plakortis simplex*). These five new sequences form a strongly supported clade phylogenetically related to the *NK6* and *NK7* families from cnidarians and bilaterians, possibly also to the *AmqNK567* gene from *A. queenslandica*, although feebly supported. Our ISH analysis of the *OlobNK* gene, in whole mount specimens and tissue sections of *O. lobularis* (containing gametes and various developmental stages), revealed exclusive expression in the choanocytes<sup>(31)</sup> (Fig. 5).

Structural similarities between choanocytes and eumetazoan sensory cells such as mecanoreceptors<sup>(79)</sup> have been already evocated. Furthermore, major expression of the *NK6* and *NK7* families of bilaterian homeobox genes (the closest relatives of homoscleromorphs *NK* genes in our phylogene-



Figure 5. Expression pattern of *OlobNK* observed on sections at (A) high and (B) low magnifications; only the choanocytes are stained, non-reproductive specimen. (CC) Ch: choanocyte chamber; Ca: canal; Me: mesohyl.

tical analyses) are neural. Thus, our expression result<sup>(31)</sup> is in line with other works suggesting possible homology between choanocytes and neurosensory cells.<sup>(13,79)</sup>

In addition to the great diversity of *NK*-like genes, members of important pathways were evidenced in the sponges *A. queenslandica*, *S. domuncula* and *O. carmela*.<sup>(23,26–28,33,80)</sup> In our *O. lobularis*, various genes coding for molecules of the Notch signalling pathway are under study by our team (unpublished data). Preliminary results suggest that this pathway may form a complex network in the last common ancestor of Metazoa.

Concerning the famous Wnt signalling pathway involved in primordial developmental events in Eumetazoa such as gastrulation and axis patterning, we characterized in *O. lobularis Wnt* genes and genes coding for other members of this pathway<sup>(81)</sup> (Lapébie *et al.*, in preparation). As far as its role is concerned, initial expressional data in *A. queenslandica* are consistent with an ancestral implication of Wnt signalling in embryonic axis patterning.<sup>(75)</sup> Preliminary expression analysis of the two *O. lobularis Wnt* genes on adult specimens revealed complementary regionalized expression patterns in an outer epithelial layer, the exopinacoderm (Lapébie *et al.*, in preparation), suggesting that employment of WNT signalling in epithelial patterning and morphogenesis is an ancient metazoan feature.

As genetic and genomic data on sponges are becoming more extensive, the idea of the 'simplicity' of sponges and of the common ancestor of Metazoa seems less and less convincing.<sup>(24,33,75,82,83)</sup> However, data on developmental gene expression must be accumulated and compared between different sponge lineages and eumetazoans in order to understand the mechanisms involved in the evolution of metazoan body plans and genomes.

#### Conclusion and perspectives

In this paper, we have shown the reasons why we feel that our knowledge of *Oscarella* and our experience of working with it

BioEssays 31:89-97, @ 2009 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

justify offering our favourite animal as a candidate as a new sponge model for evolutionary developmental studies. The phylogenetic position and distinctive features of the organization and development of *Oscarella* will provide a basis for answering a number of relevant questions in modern biology.

Homoscleromorph sponges display many morphological, cytological, biochemical and embryological features that distinguish them from other sponges and are more evocative of the Eumetazoa.<sup>(44,48,51,68,70)</sup> For example, they are the only sponges to possess a basement membrane with collagen IV, tenascin and laminin, (44,45) presently considered as a synapomorphy of eumetazoans. Thus, Homoscleromorpha is a unique sponge group that could be called 'epitheliosponges,<sup>(47)</sup> since only this sponge group has a true epithelial structure and an epithelial morphogenesis. Three explanations are possible for the presence of basement membrane in homoscleromorphs and eumetazoans: (i) a convergent development in homoscleromorphs and eumetazoans, (ii) its presence in the common ancestor of Homoscleromorpha-Eumetazoa clade or (iii) its presence in metazoan ancestor, with loss in sponges except in Homoscleromorpha. The choice among these alternative scenarios requires a more complete phylogenetic framework. But, even if the homology between basement membranes of Homoscleromorpha and Eumetazoa remains to be confirmed,<sup>(84)</sup> Homoscleromorpha appear to be a model of particular interest for comparing cell movement processes occurring during morphogenesis with those of eumetazoan, and to understand the origin and evolution of epithelia.

Our second centre of interest concerns the origin of the polarities. Bilaterians have two principal body axes, dorsoventral and anterio-posterior, while sponges have a single main axis of polarity (clear in sponge larvae, but not always in adults). The relationships between the polarities of bilaterian and non-bilaterian animals remain a fundamental unresolved issue in evolution/developmental biology. Morphological research can only reveal external similarities. To what extent are these axes defined and patterned by shared molecular and cellular mechanisms in sponges? Were polarity generating mechanisms derived from a common metazoan ancestor, or have they been adopted independently in different evolutionary lineages?

Nowadays, molecular data clearly indicate that sponges and bilaterians share highly conserved homologies of basic genetic machineries involved in cell differentiation, axis formation and development control. In the light of the concept that results from only one sponge clade, which cannot be generalized to all sponges,<sup>(35)</sup> future researches on *O. lobularis*, will be an important contribution to the knowledge of the early metazoan evolution events. Acknowledgments: This study is dedicated to Dr. Nicole Boury-Esnault who has been our team leader, playing a key role in recent demonstrations of the unique position of sponges in metazoan evolution, and encouraging each of us to investigate Homoscleromorpha. We gratefully acknowledge the assistance of Daria Tokina (Zoological Institute RAS, St. Petersburg, Russia), Chantal Bézac, Christian Marschal (Centre d'Océanologie de Marseille, France) and Olivier Thomas (Université de Nice, France) for their technical or scientific help. This work was partly supported by programs: Russian Foundation for Basic Research (RFBR no. 06-04-48660), European Marie Curie Mobility program (fellowship of A. Ereskovsky, MIF1-CT-2006-040065) and the ECIMAR program (Agence Nationale de la Recherche, France).

#### References

- Müller, W. E. G., Review: how was metazoan threshold crossed? The hypothetical Urmetazoa. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001. 129: 433–460.
- Müller, W. E. G., Wiens, M., Adell, T., Gamulin V., Schroder, H. C., et al. Bauplan of Urmetazoa: basis for genetic complexity of metazoa. Int Rev Cyt 2004, 235: 53–92.
- Minchin, E. A., The Porifera and Coelenterata. London, Adam and Charles Black 1900.
- Borchiellini, C., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Le Parco, Y., Phylogenetic analysis of the Hsp70 sequences reveals the monophyly of Metazoa and specific phylogenetic relationships between animals and fungi. *Mol Biol Evol* 1998. 15: 647–655.
- Borchiellini, C., Chombard, C., Lafay, B. and Boury-Esnault, N., Molecular systematics of sponges (Porilera). *Hydrobiologia* 2000. 420: 15–27.
- Kruse, M., Leys, S. P., Müller, I. M. and Müller, W. E. G., Phylogenetic position of the Hexactinellida within the phylum Porifera based on the amino acid sequence of the protein kinase C from Rhabdocalyptus dawsoni. J Mol Evol 1998. 46: 721–728.
- Dellaporta, S. L., Xu, A., Sagasser, S., Jakob, W. and Moreno, M. A., et al. Mitochondrial genome of Trichoplax adhaerens supports Placozoa as the basal lower metazoan phylum. *PNAS* 2006. 103: 8751– 8756.
- 8. Telford, M., Animal phylogeny. Curr Biol 2006. 16: 981-985.
- Hooper, J. N. A. and van Soest, R. W. M. editors. Systema Porifera: a guide to the classification of sponges. New York, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2002.
- Borchiellini, C., Manuel, M., Alivon, E., Boury-Esnault, N., Vacelet, J. and Le Parco, Y., Sponge paraphyly and the origin of Metazoa. *J Evol Biol* 2001. 14: 171–179.
- Sperling, E. A., Pisani, D. and Peterson, K. J., Porileran paraphyly and its implications for Precambrian palaeobiology. *Geol Soc London Spec Publ.* 286: 355–368.
- Wang, X. and Lavrov, D. V., Seventeen new complete mtDNA sequences reveal extensive mitochondrial genome evolution within the Demospongiae. *PLoS ONE* 2008. 3(7), e2723. doi:10.1371; 1-11.
- Nielsen, C., Six major steps in animal evolution: are we derived sponge larvae? Evol Dev 2008. 10: 241–257.
- Borchiellini, C., Chombard, C., Manuel, M., Alivon, E. and Vacelet, J., et al. Molecular phylogeny of Demospongiae: implications for classification and scenarios of character evolution. *Mol Phyl Evol* 2004. **32**: 823– 837.

BioEssays 31:89-97, © 2009 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

- Nichols, S. A., An evaluation of support for order-level monophyly and interrelationships within the class Demospongiae using partial data from the large subunit rDNA and cytochrome oxidase subunit I. *Mol Phyl Evol* 2005. 34: 81–96.
- Dohrmann, M., Janussen, D., Reitner, J., Collins, A. G. and Wörheide, G., Phylogeny and evolution of glass sponges (Porilera, Hexactinellida). Syst Biol 2008. 57: 388–405.
- Medina, M. N., Collins, A. G., Silberman, J. D. and Sogin, M. L., Evaluating hypothesis of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *PNAS* 2001. 98: 9707–9712.
- Manuel, M., Borchiellini, C., Alivon, E., Le Parco, Y., Vacelet, J. and Boury-Esnault, N., 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* 2003. 52: 311–333.
- Wang, X. and Lavrov, D. V., Mitochondrial genome of the Homoscleromorph Oscarella carmela (Porifera, Demospongiae) reveals unexpected complexity in the common ancestor of sponges and other animals. *Mol Biol Evol* 2007. 24: 1–11.
- Dunn, C. W., Hejnol, A., Matus, D. Q., Pang, K., Browne, W. E., et al. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 2008, 452: 745–749.
- Lavrov, D. V., Wang, X. and Kelly, M., Reconstructing ordinal relationships in the Demospongiae using mitochondrial genomic data. *Mol Phyl Evol* 2008. 49: 111–124.
- Wiens, M., Mangoni, A., D'Esposito, M., Fattorusso, E., Korchagina, N., et al. The molecular basis for the evolution of the Metazoan bodyplan: extracellular matrix-mediated morphogenesis in marine Demosponges. J Mol Evol 2003. 57: 60–75.
- Larroux, C., Fahey, B., Degnan, S. M., Adamski, M., Rokhsar, D. S., et al. The NK homeobox gene cluster predates the origin of Hox genes. *Curr Biol* 2007. 17: 1–5.
- Larroux, C., Fahey, B., Liubicich, D., Hinman, V. F., Gauthier, M., et al. Developmental expression of transcription factor genes in a demosponge: insights into the origin of metazoan multicellularity. *Evol Dev* 2006. 8: 150– 173.
- Richelle-Maurer, E., Boury-Esnault, N., Itskovich, V. B., Manuel, M., Pomponi, S. A. and Van de Vyver, G., Conservation and phylogeny of a novel family of non-Hox genes of the Antp class in Demospongiae (Porifera). J Mol Evol 2006. 63: 222–230.
- Adamska, M., Matus, D. Q., Adamski, D., Green, K., Rokhsar, D. S., et al. The evolutionary origin of hedgehog proteins. *Curr Biol* 2007. 17: R836–R837.
- Adamska, M., Degnan, B. M., Green, K. M., Amanski, M., Craigie, A., et al. Wnt and TGF-beta expression in the sponge Amphimedon queenslandica and the origin of Metazoan embryonic patterning. *PLoS ONE* 2007. 2: e1031.
- Adell, T., Thakur, A. N. and Müller, W. E. G., Isolation and characterization of Wnt pathway-related genes from Porifera. *Cell Biol Int* 2007. 31: 939–949.
- Sakarya, O., Armstrong, K. A., Adamska, M., Adamski, M., Wang, I.-F., et al. A post-synaptic scallold at the origin of the animal kingdom. *PLoS* ONE 2007, 2(6), e506.
- Fathey, B., Larroux, C., Woodcroft, B. J. and Degnan, B. M., Does the high gene density in the sponge NK Homeobox gene cluster reflect limited regulatory capacity? *Biol Bull* 2008. 214: 205–217.
- Gazave, E., Lapébie, P., Renard, E., Bézac, C., Boury-Esnault, N., et al. A novel family of NK homeobox genes with choanocyte-specific expression in homoscleromorph sponges. *Dev Gen Evol* 2008. 218: 479–489.
- Larroux, C., Luke, G. N., Koopman, P., Rokhsar, D. S., Shimeld, S. M. and Degnan, B. M., Genesis and expansion of metazoan transcription factor gene classes. *Mol Biol Evol* 2008. 25: 980–996.
- Nichols, S. A., Dirks, W., Pearse, J. S. and King, N., Early evolution of animal cell signaling and adhesion genes. *PNAS* 2006. 103: 12451– 12456.
- Richards, G. S., Simionato, E., Perron, M., Adamska, M., Vervoort, M. and Degnan, B. M., Sponge genes provide new insight into the evolutionary origin of the neurogenic circuit. *Curr Biol* 2008. 18: 1156– 1161.

- Collins, A. G., Caertwright, P., McFadden, C. S. and Schierwater, B., Phylogenetic context and basal metazoan model systems. *Integr Comp Biol* 2005, 45: 585–594.
- Korschak, R. D., Samuel, G., Saint, R. and Miller, D. J., EST analysis of the cnidarian Acropora millepora reveals extensive gene loss and rapid sequence divergence in the model invertebrates. *Curr Biol* 2003. 13: 2190–2195.
- Hughes, A. L. and Friedman, R., Loss of ancestral genes in the genomic evolution of Ciona intestinalis. *Evol Dev* 2005. 7: 196–200.
- Jenner, R. A. and Wills, M. A., The choice of model organisms in evodevo. Nat. Rev. Genet. 2007. 8: 311.
- Zou, S. M., Jiang, X. Y., Yuan, J., Yuan, X. N., et al. Hox gene clusters in blunt snout bream, Megalobrama amblycephala and comparison with those of zebrafish, fugu and medaka genomes. *Gene* 2007. 400: 60–670.
- Lévi, C. and Porte, A., Etude au microscope électronique de l'éponge Oscarella lobularis Schmidt et de sa larve amphiblastula. *Cah Biol Mar* 1962. 3: 307–315.
- Muricy, G., Boury-Esnault, N., Bézac, C. and Vacelet, J., Cytological evidence for cryptic speciation in Mediterranean Oscarella species (Porifera, Homoscleromorpha). *Can J Zool* 1996. 74: 881–896.
- Muricy, G. and Pearse, J. S., A new species of Oscarella (Demospongiae: Plakinidae) from California. *Proceeding Calif Acad Sci* 2004. 55: 598–612.
- Ereskovsky, A. V., A new species of Oscarella (Demospongiae: Plakinidae) from the Western Sea of Japan. Zootaxa 2006. 1376: 37–51.
- Boute, N., Exposito, J.-Y., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Noro, N., et al. Type IV collagen in sponges, the missing link in basement membrane ubiquity. *Biol Cell* 1996. 88: 37–44.
- Humbert-David, N. and Garrone, R., A six-armed, tenascin-like protein extracted from the Porifera Oscarella tuberculata (Homosclerophorida). *Eur J Biochem* 1993. 216: 255–260.
- Exposito, J.-Y., Cluzel, C., Garrone, R. and Lethias, C., Evolution of collagens. Anat Rec 2002. 268: 302–316.
- Ereskovsky, A. V. and Tokina, D. B., Asexual reproduction in homoscleromorph sponges (Porifera; Homoscleromorpha). *Mar Biol* 2007. 151: 425–434.
- Boury-Esnault, N., Ereskovsky, A. V., Bézac, C. and Tokina, D. B., Larval development in Homoscleromorpha (Poritera, Demospongiae). *Invert Biol* 2003. 122: 187–202.
- Keller, R., Davidson, L. A. and Shook, D. R., How we are shaped: the biomechanics of gastrulation. *Differentiation* 2003. 71: 171–205.
- Morris, P. J., The developmental role of the extracellular-matrix suggests a monophyletic origin of the kingdom animalia. *Evolution* 1993, 47: 152–165.
- Ereskovsky, A. V. and Boury-Esnault, N., Cleavage pattern in Oscarella species (Porifera, Demospongiae, Homoscleromorpha), transmission of maternal cells and symbiotic bacteria. J Nat Hist 2002. 36: 1761–1775.
- Ereskovsky, A. V., Tokina, D. B., Bézac, C. and Boury-Esnault, N., Metamorphosis of Cinctoblastula larvae (Homoscleromorpha, Porifera). *J Morphol* 2007. 268: 518–528.
- Gaino, E., Burlando, B. and Buffa, P., Structural and ultrastructural aspects of growth in Oscarella lobularis (Porifera, Demospongiae). *Growth* 1987. 51: 451–460.
- Ereskovsky, A. V. and Gonobobleva, E. L., New data on embryonic development of Halisarca dujardini Johnston, 1842 (Demospongiae, Halisarcida). 2000. Zoosystema 22: 355–368.
- Gonobobleva, E. L. and Ereskovsky, A. V., Metamorphosis of the larva of Halisarca dujardini (Demospongiae, Halisarcida). *Bull Inst Roy Sci Nat Belgique, Biol* 2004. 74: 101–115.
- Franzen, W., Oogenesis and larval development of Scypha ciliata (Porilera, Calcarea). *Zoomorphology* 1988. 107: 349–357.
- Leys, S. P. and Eerkes-Megrano, D., Gastrulation in calcareous sponges: in search of Haeckel's gastraea. *Integr Comp Biol* 2005. 45: 342–351.
- Topsent, E., Etude monographique des spongiaires de France. II. Carnosa. Arch Zool expér gén 1895. 3: 493–590.
- Boury-Esnault, N., Solé-Cava, A. M. and Thorpe, J. P., Genetic and cytological divergence between colour morphs of the Mediterranean sponge Oscarella lobularis Schmidt (Porilera, Demospongiae, Oscarellidae). J Nat Hist 1992. 26: 271–284.

BioEssays 31:89-97, @ 2009 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Kornprobst, J. M., Spongiaires (Eponges). In: Kornprobst, J. M. editor. Substances naturelles d'origine marine: chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologie. Paris, Lavoisier Publisher, 2005. pp. 601–684.
- Aiello, A., Fattorusso, E., Magno, S., Mayol, L. and Menna, M., Isolation of two novel 5 alpha,6 alpha -epoxy-7-ketosterols from the encrusting demospongia Oscarella lobularis. J Nat Prod 1990. 53: 487–491.
- Aiello, A., Fattorusso, E., Magno, S. and Menna, M., Isolation of five new 5-hydroxy-6-keto-7 sterois from the marine sponge Oscarella lobularis. *Steroids* 1991. 56: 337–340.
- Loukaci, A., Muricy, G., Brouard, J. P., Le Guyot, M., Vacelet, J., et al. Chemical divergence between two sibling species of Oscarella (Porifera) from the Mediterranean sea. *Biochem Syst Ecol* 2004. 32: 893–899.
- Ivanisevic, J., Thomas, O. and Pérez, T., Secondary metabolism of the sponge group Homoscleromorpha: diversity and variation of its expression in relation with biotic and abiotic factors. In 5th European conference on marine natural products. 2007. p. 170.
  Efremova, S. M., Ereskovsky, A. V., Mukhina, Y. I., Willenz, P. and
- Efremova, S. M., Ereskovsky, A. V., Mukhina, Y. I., Willenz, P. and Boury-Esnault, N., Comparative study on spermatogenesis in the Homoscleromorpha. In 7th international sponge symposium. Biodiversity, innovation, sustainability. Buzios, Brazil, Rio de Janeiro, 2006. Ser. Livros 16, p. 70.
- Gaino, E., Burlando, B., Buffa, P. and Sara, M., Ultrastructural study of spermatogenesis in Oscarella lobularis (Porifera, Demospongiae). Int J Invert Rep Dev 1986. 10: 297–305.
- Boury-Esnault, N. and Jamieson, B. G. M., 1. Porifera. In: Adiyodi, K. G. and Adiyodi, R. G. editors. Reproductive biology of invertebrates. Part A: Progress in male gamete ultrastructure and phylogeny. New Delhi. Oxford: IBH Publishing Co. 9, 1999. pp. 1–41.
- Ereskovsky, A. V., Comparative embryology of Sponges (Porifera). Saint-Petersburg, Saint-Petersburg University Press, 2005.
- Gaino, E., Burlando, B. and Buffa, P., Contribution to the study of egg development and derivation in Oscarella lobularis (Porifera, Demospongiae). Int J Invert Rep Dev 1986. 91: 297–305.
- Ereskovsky, A. V., Comparative embryology of Sponges and its application for poriferan phylogeny. *Boll Mus Ist Biol Univ Genova* 2004. 68: 301– 318.
- Meewis, H., Contribution à l'étude de l'embryogénèse des Myxospongidae: Halisarca lobularis (Schmidt). Arch Biol Liège 1938. 50: 1–66.
  Kawamura, K. and Fujiwara, S., Cellular and molecular characterization
- Kawamura, K. and Fujiwara, S., Cellular and molecular characterization of transdifferentiation in the process of morphallaxis of budding tunicates. *Semin Cell Biol* 1995. 6: 117–126.

- Hoffman, D. K. and Honegger, T. G., Bud formation and metamorphosis in Cassiopea andromeda (Cnidaria: Scyphozoa): a developmental and ultrastructural study. *Mar Biol* 1990. 105: 509–518.
  Peterson, K. J. and Sperling, E. A., Poriferan ANTP genes primitively
- Peterson, K. J. and Spering, E. A., Ponieran ANTP genes primitively simple or secondarily reduced? *Evol Dev* 2007. 9: 405-408.
  Garcia-Fernández, J., The genesis and evolution of Homeobox gene
- clasters. Nat Rev Genet 2005. 6: 881–892.
- Chourrout, D., Delsuc, F., Chourrout, P., Edvardsen, R. B., Rentzsch, F., et al. Minimal ProtoHox cluster inferred from bilaterian and chidarian Hox complements. *Nature* 2006. 442: 684–687.
- Kamm, K. and Schierwater, B., Ancient complexity of the non-Hox ANTP gene complement in the anthozoan Nematostella vectensis. Implications for the evolution of the ANTP superclass. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* 2006. 306B: 589–596.
- Putnam, N. H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., et al. Sea Anemone genome reveals ancestral Eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science* 2007. 317: 86–94.
- Jacobs, D. K., Nakanishi, N., Yuan, D., Camara, A., Nichols, S. A., Hartenstein, V., Evolution of sensory structures in basal metazoa. *Integr Comp Biol* 2007. 47: 712–723.
- Adell, T., Nefkens, I. and Müller, W. E. G., Polarity factor 'Frizzled' in the demosponge Suberites domuncula: identification, expression and localization of the receptor in the epithelium/pinacoderm. *FEBS Lett* 2003. 554: 363–368.
- 81. Lapébie, P., Gazave, E., Renard-Deniel, E., Boury-Esnault, N. Perez, T., et al. Whi pathway putative functions in the metazoan common ancestor. Contribution of a sponge model: Oscarella lobularis (Homoscleromorpha). In 10th evolutionary biology meeting at Marseilles 2006, September. 2006. pp. 20–22.
- Manuel, M. and Le Parco, Y., Homeobox gene diversification in the calcareous sponge, Sycon raphanus. *Mol Phyl Evol* 2000. 17: 97–107.
- Wang, X. and Lavrov, D. V., Mitochondrial genome of the Homoscleromorph Oscarella carmela (Porifera, Demospongiae) reveals unexpected complexity in the common ancestor of sponges and other animals. *Mol Biol Evol* 2007, 24: 1–11.
- 84. Aouacheria, A., Geourjon, C., Aghajari, N., Navratil, V., Deleage, G., et al. Insights into early extracellular matrix evolution: spongin short chain collagen-related proteins are homologous to basement membrane type IV collagens and form a novel family widely distributed in invertebrates. *Mol Biol Evol* 2006. 23: 2288–2302.

BioEssays 31:89-97, © 2009 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

# B.2 : Cycle de vie et effort reproducteur de deux espèces d'Oscarella

#### **B.2.1 : Présentation de l'article**

La reproduction et les traits d'histoire de vie des organismes marins sont grandement modulés par divers facteurs biotiques et abiotiques tels que la température, la salinité, la disponibilité en nourriture et l'hydrodynamisme. Il a ainsi été démontré que ces facteurs affectent les processus reproducteurs et développementaux chez les éponges. Au sein des homoscléromorphes, il existe cinq espèces du genre Oscarella en Méditerranée, cependant, très peu de données sur leur biologie et leurs cycles reproducteurs sont disponibles. L'étude du cycle de vie et de l'effort reproducteur de notre modèle homoscléromorphe Oscarella lobularis (ainsi que de son espèce « sœur » O. tuberculata) a donc été initiée et comparée avec les variations naturelles de température. Cette étude de trois à quatre années (suivant l'espèce) a permis de mettre en évidence que la reproduction chez ces deux espèces avait lieu une seule fois par an. Ces espèces sont ovovipares, majoritairement gonochoriques et rarement hermaphrodites. Les sex ratio sont déséquilibrés (en faveur de femelles pour O. tuberculata et en faveur des mâles pour O. lobularis) et variables en fonction du temps. Chez O. lobularis, la spermatogenèse débute en juin et l'ovogenèse en mai, alors que chez O. tuberculata, ces étapes sont plus précoces (avril et janvier respectivement). Le développement des embryons a lieu de mi-juillet à mi-septembre pour O. lobularis et mi-juin à mi-septembre pour O. tuberculata.

Ce travail dont je suis co-auteur a fait l'objet d'un article de recherche qui sera soumis prochainement à Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.

# B.2.2 : Article 2: Pluri-annual study of the reproduction of two Mediterranean *Oscarella* species (Porifera, Homoscleromorpha): cycle, sex-ratio and reproductive effort

Pluri-annual study of the reproduction of two Mediterranean *Oscarella* species (Porifera, Homoscleromorpha): cycle, sex-ratio and reproductive effort

Alexander V. Ereskovsky <sup>(1, 2\*)</sup>, Maude Dubois <sup>(1)</sup>, Eve Gazave <sup>(1)</sup>, Julijana Ivanisevic <sup>(1)</sup> Pascal Lapebie <sup>(1)</sup> Daria Tokina <sup>(3)</sup>, Chantal Bézac <sup>(1)</sup> and Thierry Pérez <sub>(1)</sub>

<sup>(1)</sup> Centre d'Océanologie de Marseille, Station marine d'Endoume, Aix-Marseille Université -CNRS UMR 6540-DIMAR, rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille, France

<sup>(2)</sup> Department of Embryology, Faculty of Biology, University of St-Petersburg, Universitetskaya nab, 7/9, Saint Petersburg, Russia

<sup>(3)</sup> Zoological Institute Russian Academy of Sciences, Universitetskaya nab, 1, Saint Petersburg, Russia

\* Corresponding author

# Abstract

The reproductive cycles of two homoscleromorph species, *Oscarella tuberculata* and *O. lobularis* (Homoscleromorpha) and their variations in relation to abiotic factors (i.e. natural temperature variations) have been investigated. *O. tuberculata* and *O. lobularis* are quite common in shallow waters (2-24 m) of the NW Mediterranean basin. These species are ovoviviparous and rarely hermaphrodite. In both species, male and female gametes derive from choanocytes and the spermatogenesis occurs asynchronously inside of the spermatic cysts. Spermatocysts are localized in all the choanosome. Eggs, embryos and larvae are generally concentrated into the basal part of sponge and patched around large exhalant canals. The result of embryogenesis is a cinctoblastula larva. The reproduction (gametogenesis and embryogenesis) leads to localized destruction of parental tissue.

The spermatogenesis and embryogenesis occur in similar period for both species in contrary to oogenesis. Sex ratios are in favor of females in *O. tuberculata*, and in male in *O. lobularis*. In both cases, variability in sex ratio is noticeable. The reproductive efforts are variable in time and are discussed in light of environmental conditions such as fluctuation of water temperature.

Keywords: Reproduction, Reproductive effort, Phenology, Oscarella, Mediterranean.

# **1. Introduction**

Reproductive biology studies, including mode of sexuality and sex ratio (Szmant, 1986), gamete production (Beiring and Lasker, 2000), reproductive effort (Ereskovsky, 2000), recruitment (Edmunds et al., 2001), and sexual phenotypic plasticity (Bates, 2005) studies are fundamental to the comprehension of the marine population dynamics. Reproductive and life history patterns of marine invertebrates are influenced by several environmental forcings that include temperature and salinity seasonal fluctuations, hydrodynamic, and food availability (Morrissey and Sumich, 2009).

Sponges (phylum Porifera) are organisms with a high morphological plasticity. Moreover, they are characterized by a high variability of their life and reproductive cycles (for review see: Fell, 1993; Sara, 1993). Water temperature has been frequently assumed to be a major environmental factor regulating the reproduction of sponges. Although such regulation would be expected, it has been documented in only few cases (Storr, 1964; Wells at al., 1964; Simpson, 1968; Fell, 1976; Elvin, 1976; Fell and Jacob, 1979; Kaye and Reiswig, 1991; Witte, 1996; Ereskovsky, 2000; Gerasimova and Ereskovsky, 2007; Ettinger-Epstein et al., 2007; Riesgo and Maldonado, 2008; Whalan et al., 2008). Consequently, more extensive information concerning the relationships between water temperature, reproductive activity and life cycle would be important.

Until the end of 1970s, available data on reproduction in sponges were primarily based on sporadic field observations (for review see Simpson, 1984; Ereskovsky, 2010). More recently, some research focused on the investigation of reproductive cycles of sponges of given populations, and even of target individuals monitored all through their reproductive cycle. Such informations concerning some Mediterranean species of Demospongiae are already available: *Mycale contarenii, Tethya citrina, T. aurantium, Tetilla* sp., *Geodia cydonium, Spongia officinalis, Axinella damicornis, Raspaciona aculeata*, and *Chondrosia reniformis* (Corrieiro et al., 1996, 1998; Meroz-Fine et al., 2005; Perez et al., 2006; Mercurio et al., 2007; Baldacconi et al., 2008).

The Homoscleromorpha is a distinct monophyletic group with an unclear phylogenetic position within the Porifera (Borchiellini et al., 2004; Nichols, 2005; Wang and Lavrov, 2008). In the Mediterranean Homoscleromorpha includes 22 valid species, most of which only grow sparsely with distributions often limited to dark submarine caves. In some places, homoscleromorphs can be predominant and constitute particular facies. They seem to be strong competitors for space, overgrowing massive sponges, sea fans and erected bryozoans (e.g., Diaz, van Soest, 1994;

Muricy, Diaz, 2002). Nevertheless, among these species we only have the description of reproductive cycle for one species - *Corticium candelabrum* (Riesgo et al., 2007).

Sponges belonging to genus *Oscarella* Vosmaer, 1884 are often small, fragile and always lack spicules and a fibrous skeleton, making them difficult to identify. Attempts to define species of *Oscarella* by morphological features have led to a confusing reduction of species names. There are five *Oscarella* species in Mediterranean Sea (Muricy et al., 1996). In the absence of good taxonomic criteria, *Oscarella lobularis* for a long time was considered as a species which was very variable in color and consistency, and having a very wide distribution. It was only in 1992 that it was recognized that a second species, *O. tuberculata*, occurred in the Mediterranean (Boury-Esnault et al., 1992). This species had been inextricably confused with *O. lobularis* in all the numerous previous studies, especially those on embryology (for review see Ereskovsky et al., 2009b).

Although sponges from the genus *Oscarella*, are often abundant in the coastal waters of north Mediterranean, little is known of their biology, including reproductive cycles. By the end of the 19th century, the embryology of the common species *O. tuberculata* was extensively studied (Giard, 1873; Carter, 1874; Barrois, 1876; Schulze, 1877, Heider, 1886). Subsequently, several studies partly described the reproduction and larvae of several species (Meewis, 1938; Lévi and Porte, 1962; Tuzet and Paris, 1964; Baccetti et al., 1986; Gaino et al., 1986a, b): ultrastructural studies of the egg development (Gaino et al., 1986a) and spermatogenesis (Baccetti et al., 1986; Gaino et al., 1986b), of the embryo cleavage and larval development (Ereskovsky and Boury-Esnault, 2002; Boury-Esnault et al., 2003), metamorphosis (Boury-Esnault et al., 2003; Ereskovsky et al., 2007), and asexual reproduction (Ereskovsky and Tokina, 2007).

The aim of the present study is to investigate the detailed description of the reproduction of two sibling homoscleromorph species *Oscarella tuberculata* and *O. lobularis* and present their reproductive cycles. Here, we accurately measured reproductive efforts throughout several years of investigations and assess their relations with natural temperature variations.

## 2. Material and methods

#### 2.1. Collection

This work was performed on two distinct collections of *Oscarella tuberculata* (Schmidt, 1868) and *O. lobularis* (Schmidt, 1862) sampled by SCUBA diving. A first collection was built up with individuals sampled between June 1987 and September 2005 in different locations of the NW Mediterranean (Fig. 1). The second collection was obtained by sampling about 7 individuals of

*O. tuberculata* and of *O. lobularis* as following (Fig. 2). *Oscarella tuberculata* was collected monthly during two periods: from October 2001 to August 2003 and from June 2006 to January 2009. *Oscarella lobularis* also was collected monthly during three years 2006, 2007 and 2008. During the period of the reproduction (from June to August) sponges were collected weekly. All samples came from a well defined population, located between 14 and 16 m depth, at the "Grotte à Corail" location (Maîre Island, Marseille). The site was equipped with a permanent temperature recorder (HOBO Tidbit Data Logger).

During the whole period of investigation, we studied 221 individuals of *O. tuberculata* and 242 of *O. lobularis*.

# 2.2. Morphological and ultrastructural analysis

To characterize the life cycle and assess the reproductive effort, sub-samples were fixed in Bouin fixative. Then tissue fragments were dehydrated through an ethanol series, and embedded in paraffin. Serial sections of 6  $\mu$ m in thickness were mounted on glass slides and stained with Trichrome of Masson and Goldner hematoxylin and then observed under a light microscope WILD M20.

To describe gametogenesis and embryonic development, sub-samples were fixed with a standard fixation method using glutaraldehyde 2.5% in a mixture of 0.4M cacodylate buffer and seawater (1 vol: 4 vol.: 5 vol.; 1120 mOsm). After fixation, samples were washed in 0.1 M phosphate buffer and post-fixation in 2%  $OsO_4$  in sea water at room temperature, dehydrated through a graded ethanol series, and embedded in Araldite (Boury-Esnault et al., 1984). Semi-thin sections were stained with toluidine blue and then observed under a light microscope WILD M20. Digital photos were made on the microscope Leica DMLB with the system of photo capture Evolution LC color.

For SEM the specimens were fractured in liquid nitrogen, critical-point-dried, sputter-coated with gold-palladium, and observed under a Hitachi S 570 SEM.

### 2.3. Data analysis

The calculations of reproductive efforts were carried out on the serial histological sections. For each specimen, we analysed digital photos of 16 sections for every sponge (four photos from four serial sections, in order to avoid the overlapping of reproductive products that would lead to overestimation). We determined the number of reproductively active sponge over time and estimated number and area ( $\mu$ m<sup>2</sup>) of each reproductive element (spermatocyste, oocyte, embryo and larva) using the ImageJ Software (<u>http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html</u>).

Reproductive efforts were expressed as percentage of reproductive tissue (mean  $\pm$  s.d) for each type of reproductive product in the reproductive individuals.

The potential difference between reproductive effort in both species and for each sex was assessed with a Kruskal-Wallis nonparametric rank-sum tests (H) and a Tukey's (honestly significant differenced, or HSD) test.

# 3. Results

#### 3.1. General characteristic

*Oscarella tuberculata* (Fig. 2 A) is thinly encrusting to lobate, but its color is highly variable (yellow, green, blue and sometimes pink). *Oscarella lobularis* is also thinly encrusting to lobate, from white to deep purple and sometimes blue (Fig. 2B). Their consistencies are different, rather cartilaginous for *O. tuberculata*, and soft for *O. lobularis*. Both species are common in shallow coralligenous community from 2 to 50 m and inside caves in semi-dark to dark (*O. tuberculata*) conditions (Ereskovsky et al., 2009 a). *O. lobularis* has been found down to 300 m,

The anatomy of both species is similar, with inhalant ostia regularly scattered over the surface (Fig. 3a, b), oscules at the top of lobes (Fig. 2) and a sylleibid-like (radial arrangement of chambers around exhalant canals), with eurypylous choanocyte chambers. The thin unspecialized ectosome and the canals are lined by a regular layer of pinacocytes, which are relatively flat uniflagellated cells (Fig. 3c,d) connected by specialized cell junctions. (Ereskovsky et al. 2009 b). Beneath epithelium situated thin mesohyl layer which contains regularly distributed choanocyte chambers, symbiotic bacteria and scattered cells, including vacuolar cells which may be characteristic of the different *Oscarella* species. *Oscarella tuberculata* harbors one distinct type of large vacuolar cell (Fig. 3e), whereas *O. lobularis* have two types of vacuolar cell (Fig. 3f) (Boury-Esnault et al., 1992). Both species also possess specific symbiotic bacteria belonging to two in *O. tuberculata* and three morphotypes in *O. lobularis*, that can be recognized by electron microscopy studies (Vishnyakov and Ereskovsky, 2009).

#### 3.2. Sex ratio

Both species are ovoviviparous, predominantly gonochoric. Nevertheless there are rare individuals containing both male and female sexual cells. During the reproductive seasons, many individuals did not have any reproductive elements.

## Oscarella tuberculata

The population of *O. tuberculata* from Maire Island contains 13.6% of male, 26.7% of females and 59.7% of non reproductive sponges during all monitoring period (Fig. 4a). Considering all morphs sampled, the sex ratio in *O. tuberculata* is generally about 1/3 (male/female). Nevertheless there was a variability of the sex ratio between different years: 1/3.4 in 2002, 1/3.7 in 2003, 1/3 in 2007, and 1/1 in 2008.

#### Oscarella lobularis

*O. lobularis* monitored populations during 2006-2008 contain 31.8% male, 3.3% female, 1.7% hermaphrodite and 63.2% sponges without reproductive elements (Fig. 4b). The sex ratio in *O. lobularis* is generally about 10/1 (male/female). As observed for *O. tuberculata*, a variability of the sex ratio between different years is noticeable: 11/1 in 2006, 1.75/1 in 2007, and 26/1 in 2008.

#### 3.3. Gametogenesis

#### 3.3.1. Spermatogenesis

The spermatogenesis is identical in both *Oscarella* species. It occurs in cysts located in the sponge choanosome (Fig. 5A, 6A,C). A thick layer of collagen surrounds the spermatic cyst. Spermatocysts come from choanocyte chambers differentiation. They are ovoid and 15 to 60  $\mu$ m in size (Fig. 5A). The spermatogenesis is asynchronous. Cysts generally contain several generations of male germ cells which form clusters (Fig. 5A, B). Spermatogonia have the same dimension than choanocytes. During the spermatogenesis, some ultrastructural modifications lead to a shrinkage of the cell and the nuclei. The collar of the choanocytes disappears, and the nucleus moved from the basal to the apical part of the cell. The mature spermatozoa have a terminal long flagella and a slightly elongated head containing the acrosome and a large mitochondrion.

#### 3.3.2. Oogenesis

The female germ cells have also a choanocyte origin in both species. Young oocytes are amoeboid cells randomly distributed throughout the mesohyl with 15-40  $\mu$ m in dimension (Fig. 5C). During the vitellogenesis, they increase rapidly up to 130–150  $\mu$ m in diameter. Mature eggs are isolecythal and polylecithal, with a cytoplasm full of yolk granules and some lipid droplets surrounding the nucleolate nucleus (Fig. 5D). Eggs are located in the basal part of the choanosome (Fig. 6 B,D). Mature eggs are completely surrounded by a follicle made of endopinacocytes (Fig. 5D).

#### 3.4. Embryonic development

Both *Oscarella* species have the same pattern of embryonic development. It occurs inside a follicle at the basal part of the choanosome (Fig. 6 B,D). The cleavage is holoblastic, equal, and synchronous during the first two divisions. With the third division, the cleavage becomes asynchronous and results in a solid apolar stereoblastula (morula) of  $130 - 170 \mu m$  in diameter with undifferentiated yolk-rich blastomeres exhibiting a nucleolate nucleus (Fig. 5E).

The coeloblastula is the intermediate stage of development, coming from a morula after multipolar egression: a migration of internal cells towards the periphery of embryo (Figs. 5E, F). The cell differentiation and the coeloblastula axialisation result in a cinctoblastula pre-larva measuring from 130 to 200  $\mu$ m in diameter (Fig. 5G). Then, larvae are sent off the maternal sponge by exhalants canals and the osculum. They remain few days free in the water column before settling on a substrate where they transform into a young sponge. Symbiotic extracellular bacteria are present all during the embryonic development. A significant difference between cinctoblastula pre-larva of the two is the presence of the two maternal vacuolar cell types inside of the larval cavity of *O. lobularis* whereas there is no maternal vacuolar cells inside of *O. tuberculata* (Ereskovsky and Boury-Esnault, 2002).

#### 3.5. Reproductive cycle and reproductive effort

Reproductive effort of *O. tuberculata* and *O. lobularis* was calculated separately for males and females, and related to natural fluctuations of the seawater temperature from January 2002 to September 2003 for *O. tuberculata* only, and from January 2006 to October 2008 for both species. The reproductive efforts are highly variable in time.

#### Oscarella tuberculata

In *O. tuberculata* the spermatogenesis normally occurs from June to July (Fig. 7A). In the population of *O. tuberculata* from Maire Island, a small difference was observed between the spermatogenesis periods: earlier in 2002 than in 2003. During this period, the maximal reproductive effort for male was higher in 2002, representing 8% to 9% of the sponge volume, than in 2003, with only 4% to 5% (Figs. 8A, 9A). Nevertheless reproductive effort was not significantly different between 2002 and 2003 (Test of Kruskal-Wallis: H (1, N = 63) =3.145350 p = 0.076). During the second studied period (2007–2008,) the spermatogenesis was also observed in June – July, but in 2008 it started significantly earlier, at the end of April. The difference in male effort is more pronounced during this period than in the first one (Figs. 8B,

9B): the mean effort is 1.17% in 2007 against 2.83% in 2008 and it was not significant (Test of Kruskal-Wallis, H (1, N = 15) = 3.521 p = 0.060).

The oogenesis in the population of Maire Island started between January and April but the vitellogenesis occurred from May to July (Fig. 7A). The sampling performed in other locations of the Marseille region showed that oogenesis can take place until end of July. The first embryos were observed in mid-June and the release of larvae occurred between the end of July to early September (Fig. 7A). From September to January, there are generally no reproductive elements in the sponge choanosome. For female, the maximal reproductive effort can represent up to 7.9 % of the sponge volume. The effort of female was significantly different between 2002 and 2003 (Test of Kruskal-Wallis: H (1, N = 167) =6.331442 p = 0.011) with a mean of about 1% in 2002 and more than 3% in 2003. During the second period, the difference of female effort was not significant (Test of Kruskal-Wallis: H (1, N = 27) = 0.688 p = 0.407), in spite of the means 3.60% in 2007 against 7.90% in 2008.

The duration of male and female gametogenesis are thus different, but there is a synchronization of both sexes during the egg maturation (end of June – July) (Fig. 7A).

#### Oscarella lobularis

There is no reproduction in winter conditions (Fig. 7B). The maximal reproductive effort for both sexes has been always observed in July (Figs. 8C, 9C). Spermatogenesis generally occurs in two months – from June to August (Fig. 7B). For male, the highest effort was found at the end of June 2006, with 4.93% of the sponge volume, against 0.21% in July 2007 and 2.89% in July 2008 (Fig 8C, 9C). The difference of male effort have been significant between pairs of years 2006-2007 (Test of Kruskal-Wallis: H(1;51)=17.0837 p=0.00004), between 2006-2008 (Test of Kruskal-Wallis: H(1;71)=5.0114 p=0.0252), and between 2007-2008 (Test of Kruskal-Wallis: H(1;34)=9.2739 p 0.023).

The oogenesis in *O. lobularis* is slightly longer than in *O. tuberculata*, from May to August, the vitellogenesis occurring from June to mid-August (Fig. 7B). Embryogenesis occurs from mid-July to the beginning of September, and the larvae release takes place from the end of August to September. The synchronization of the two sexes is mainly observed in July (Fig. 7B). The maximal reproductive effort of female sponges was in July 2006 with 6.46% of the sponge volume (July 2007: 1.86% and September 2008 : 0.94%). Female efforts showed also significant difference between 2006-2007 (Test of Kruskal-Wallis: H(1;8)=4.0833 p= 0.0433) and between 2006-2008 (H(1;7)= 4.5000 p= 0.0339) but not between 2007-2008 (Test of Kruskal-Wallis: H(1;7)= 1.1250 p= 0.2888).

# 4. Discussion

Potential effects of global change act at different organization levels from physiological to community and can ultimately lead to a significant diversity loss and affect ecosystem functioning (Lejeusne et al. 2009). Phenology - the timing of seasonal activities (including reproduction) of animals and plants - may be the simplest process in which to track changes in the ecology of species in response to climate change (Walther et al., 2002).

Although some information on reproductive cycles of Mediterranean marine "invertebrates" is available, little is known about their reproductive efforts and relationships with environmental fluctuations.

#### Sex differentiation

There are different types of hermaphroditism and gonochorism in sponges (Sara, 1993). *Oscarella tuberculata* and *O. lobularis* seem to be predominantly gonochoristic, although few hermaphrodite individuals containing both spermatocysts and young oocytes were found during the whole period studied. *Oscarella tuberculata* was mentioned as gonochoristic for the first time by Topsent (1895). However Meewis (1938) wrote that this species from Roscoff (Atlantic coast of France) is hermaphroditic with female gametes developed more deeply within the sponge body than spermatic cysts. Tuzet and Paris (1964) considered that the representatives of this species from Banyuls-sur-Mer (it was wrongly called as *Octavella galangaui*) are gonochoristic with very rare (one specimen) hermaphroditic. Nevertheless, some other species of *Oscarella* genus from Marseille region are hermaphroditic (our unpubl. data). We can suppose that sex determination in some individuals of *O. tuberculata* and *O. lobularis* may be labile. The same situation was described in many marine ovoviviparous demosponges species (Fell, 1970; Diaz, 1973, 1979; Liaci and Sciscioli, 1967; Elvin, 1976; Sara, 1993).

Sex ratio of *O. tuberculata* is in favor of females (3:1) that seem to be quite common among Demospongiae (Scalera Liaci et al., 1971; Wapstra and van Soest 1987; Tanaka-Ichihara and Watanabe, 1990; Witte et al., 1994; Witte, 1996; Corriero et al., 1996, 1998; Mercurio et al., 2000; Meroz-Fine et al., 2005; Riesgo and Maldonado, 2008). A comparison of the sex ratios between two years show that it is remain almost constant during investigated period. That contradicts the hypothesis of thermal sex determination (see Carré and Carré, 2000).

Sex ratio of *O. lobularis* in monitored population has inverse proportion with sufficient domination of males (1:7) in comparison with *O. tuberculata* in spite of the inter year variability

of this character. If *Oscarella* is hermaphroditic, and if their sexual differentiation is thermally controlled, one can suppose that those sponges that begin gametogenesis early in the year form oocytes and those that begin later form sperm. Gametes once formed could inhibit further gametogenesis as was suggested for the freshwater sponges and polychaetes (Gilbert, 1974). In the investigated populations of both species every year individuals without any reproductive elements during the peak of reproduction were presents.

#### Gametogenesis and embryogenesis

The arrangement of spermatogenesis in spermatic cysts, deriving from choanocyte chambers in *Oscarella tuberculata* and *O. lobularis* is unusual for the sponges. Different generations of germ cells (from spermatogonia to spermatozoa) can been found together inside one spermatocyst which is not common in Demospongiae. Indeed two successive male cells generation within one spermatic cyst are often found in sponges (for review see Boury-Esnault and Jamiesson, 1999). On the contrary, asynchronous male cells development within one spermatocyst is characteristic for Homoscleromorpha (Schulze, 1877; Gaino et al., 1986a; Efremova et al., 2006; Riesgo et al., 2007).

The general pattern of oogenesis in *Oscarella* is similar to that reported for many ovoviviparous demosponges (for review see Fell, 1983; Leys and Ereskovsky, 2006). Oogenesis begins with the differentiation of primary oocytes, differentiated from the choanocytes (Gaino et al., 1986 b). Female sexual cells of both species develop asynchronously inside one sponge that was showed for the first time by Schulze (1877). The oocytes during their early development distributed in the all mesohyl of the choanosome, however the eggs are located in the basal parts of the maternal sponges. The mature eggs are isolecithal as in most sponge species and the egg nucleus occupies a central position. This is a characteristic localization for all homoscleromorphs species studied so far (Barrois, 1876, Schulze, 1877, 1880, 1881, Meewis, 1938, Tuzet and Paris, 1964; Ereskovsky and Boury-Esnault, 2002) with the exception of *Corticium candelabrum* (Riesgo et al., 2007).

Cleavage at both *Oscarella* is holoblastic, as in all animals with an isolecythal eggs (Brusca et al., 1997). Cleavage pattern in *O. tuberculata* and *O. lobularis*, as well as in all previously studied homoscleromorph species is equal, and asynchronous from the third division, and gives rise to a regular solid morula (stereoblastula) (Schulze, 1877, 1880, 1881, Meewis, 1938, Tuzet and Paris, 1964; Ereskovsky and Boury-Esnault, 2002; de Caralt et al., 2007; Maldonado and Riesgo, 2008). The stereoblastula develops into a coeloblastula by multipolar egression (Ereskovsky and

Boury-Esnault, 2002). Subsequent development results in cinctoblastula larva formation (Boury-Esnault et al., 2003).

#### **Reproductive cycle**

A better understanding of sexual reproduction in sponges must provide clues to those intrinsic and environmental factors which initiate gametogenesis, control sexual differentiation, and influence the rates of gamete production.

*O. tuberculata* and *O. lobularis* are likely iteroparous sponges with annual cycles. Their short period of sexual reproduction connected with the warmest period. Initiation of gametogenesis is really the onset of differentiation of choanocytes into primary oocytes and primary spermatocytes. This differentiation and the beginning of gametogenesis in both species is not a continuous process but occur only once a year.

In the investigated area, the spermatogenesis of *O. tuberculata* normally takes place during June and July, vitellogenesis of the oocytes occur from May to June, embryogenesis starts in mid-July and release of larvae is observed from the end of July to the beginning of September (Fig. 7A). Formation of spermatic cysts of *O. tuberculata* occurs for a relatively short period concomitantly with the highest intensity of the oogenesis.

In the population of *O. tuberculata* from Banyuls-sur-Mer, spermatogenesis occurred from May to the beginning of September, oogenesis - from June to July, and embryonic development from July to September (Tuzet and Paris, 1964). According to Gaino et al. (1986 a, b) the spermatogenesis in this species from Ligurian Sea (Italy) occurs in July, and the oogenesis occurs also between June and July. So there is not remarkable differences in the periods of the sexual reproduction stages in different populations of *O. tuberculata* from NW Mediterranean.

In *O. lobularis* the spermatogenesis normally starts in the mid of June up to August, vitellogenesis occur from July to August, embryogenesis starts in mid-July and release of larvae is observed from the end of August to September (Fig. 7B). As in the case of *O. tuberculata*, spermatic cysts of *O. lobularis* occur for a relatively short period concomitantly with the highest intensity of the oogenesis.

This sexual pattern, also reported for other demosponges probably represents the most common means of sexual reproduction among ovoviviparous sponges in temperate seas (Scalera Liaci et al., 1971, 1973; Tanaka and Watanabe, 1990; Fell, 1993; Ereskovsky, 2000; Mercurio et al., 2007; Baldacconi et al., 2007). In other homoscleromorph species such as *C. candelabrum* spermatogenesis starts in the coldest month, just before the spring rising of temperature, and

extended over a time period characterized by both cold and warm seawater. Temperature did not appear to be the main cue triggering oogenesis, because new oocytes were produced every month (de Caralt et al. 2007; Riesgo et al., 2007).

#### Reproductive effort and relation to the environment

#### Whether reproductive effort depends on the temperature regime?

Organisms obtain resources from their environment and allocate energy to different cellular compartments. The allocation of resources to somatic or reproductive compartments varies considerably according to reproductive strategy.

Reproductive effort reflects the involvement of energy to the reproduction, and can be defined as the proportion of an organism's total energy, which is directed towards reproduction. The somatic biomass certainly influences the number of embryos produced since it is related to the amount of collected and accumulated nutrients. It was showed that water warming activate temperature-signaling cascade in sponges, which stimulate all the sponge metabolism (Zocchi et al., 2003).

Reproductive effort of *O. tuberculata* and *O. lobularis* (both male and female sponges) is variable in time. The peak of reproductive effort is observed during the hydrologic summer for both species. Moreover, the maximal reproductive effort tends to be higher for both sexes when the temperature regime is warmer.

Similar annual variability of reproductive effort was shown almost in all works on the reproductive cycles of sponges (Fell, 1993; Corriero et al., 1996, 1998; Ereskovsky, 2000; Mercurio et al., 2007; Baldacconi et al., 2007; Whalan et al., 2007).

The variations of male effort in *O. tuberculata* between pairs of years: 2002 - 2003 and 2007 - 2008 were not significant. On the contrary, it is a significant difference of female efforts between 2002 - 2003 (Fig. 9A). This distinction could be linked to the thermal regime: the summer of 2003 has been characterized by a positive thermal anomaly - the average temperature of August (the peak of embryogenesis) was higher on 2°C in 2003 than in 2002 (Fig. 10A) (Garrabou et al. 2009). However, the difference of female effort was not significant in 2007 - 2008 (Fig. 9B). In *O. lobularis* the variations of male and female efforts during all investigated period (2006 - 2008) were significant with maximal value in 2006 when the mean summer temperature was higher than in 2007 and 2008 (18.01°C, 17.36°C and 17.34°C correspondingly) (Figs. 9C, 10B).

These distinctions could be related to difference of environmental conditions between the two pairs of the years. It was not significant difference between the medium temperature in June and July, at the same time, the average temperature of August was higher on 2°C in 2003 in than in

2002 (respectively 18.7 and 20.8°C) (Fig. 10A). During August, the final period of embryonic development and larval emission, the significant increase of the reproductive effort of female in 2003 was, probably, connected to the water warming. Mean annual temperature between 2006/2007 were not different (Fig. 10B). But during a period of reproduction (May – August) the temperature in 2006 was higher on about  $0.7^{\circ}$ C, that, probably, is sufficient to influence the reproduction. The difference of the temperature during these two periods of reproduction (2006/2007) may explain the decrease of the reproductive effort of male and female. In addition, the increase of the quantity of asexual and hermaphrodite individuals in 2007 could also be the consequence of lower temperature during the June and July 2007.

The results of our study on the life history characteristics of the Mediterranean homoscleromorph sponges *Oscarella tuberculata* and *O. lobularis* reveal several traits which may categorize them as opportunistic species, adapted for utilizing variable, unpredictable environments. Some features of these species may provide additional evidence for such conclusions: (1) indeterminate growth allows continuous lateral substratum occupation (Pansini and Pronzato, 1990; Garrabou and Zabala, 2001), without requiring intervening stages of sexual reproduction and recruitment; (2) localized destruction of maternal tissue during gametogenesis and embryonic development; (3) embryogenesis and larval development last over two month; (4) the average life span is more than 6 years.

Similar ecological and reproductive characteristics have been reported for many ovoviviparous demosponges inhabiting different world's regions. For example: for opportunistic *Mycale* sp. inhabiting stressful conditions in the North of Jamaica, for littoral specimens of *Haliclona permolis* from the Oregon coast of the United States, the estuarine species *Haliclona loosanoffi* and *Halichondria* sp., *Mycale fistulifera* from the Mediterranean Sea, shallow water *Halisarca dujardini*, *Halichondria panicea* and *H. sitiens* from the White Sea (Reiswig, 1973; Elvin, 1976; Fell, 1976; Fell and Jacob, 1979; Fell et al., 1979; Fell and Lewandrowsky, 1981; Lewandrowsky and Fell, 1981; Meroz and Ilan, 1995; Ereskovsky, 2000; Gerasimova and Ereskovsky, 2007).

It is well known that only eurybiont sponges are able to inhabit the shallow water with high fluctuations in temperature, salinity, illumination, hydrodynamic, and nutrition. Within the NW of Mediterranean Sea *Oscarella tuberculata and lobularis* can live in very fluctuating shallow-water environments. These species colonized coralline algae and stones in shallow-water zones (2–24 m). *O. tuberculata* survives in the areas of maximum pollution at Cortiou (Marseille, France). Moreover, this species showed a great adaptive plasticity to selection by substrate, depth and relationship to environmental variables (Carballo et al., 1996).

In conclusion, environmental factors play a significant role in regulating the life history of the sponges, which in part, involves life-cycle-dependent changes in gene expression and cell signaling. Therefore, in asking the question how reproduction regulated in sponges, we must examine how environmental factors regulate gene expression.

# Acknowledgements

This work was partly supported by programs: European Marie Curie Mobility program (fellowship of A. Ereskovsky, MIF1-CT-2006-040065) and the ECIMAR program (Agence Nationale de la Recherche, France).

# **Figure Legends**

**Fig. 1**. Map of the Northwest Mediterranean coast showing the collection sites of *Oscarella tuberculata* and *Oscarella lobularis*.

**Fig. 2.** Living *Oscarella*. Yellow-green (A) and blue (B) colour morphs of *O. tuberculata;* violet (C) and grey (D) colour morphs of *O. lobularis*.

Fig. 3. Histology and cell composition of Oscarella tuberculata and Oscarella lobularis.

**Fig. 4**. Sex ratio: Proportions of female and male in Maire Island population in NW Mediterranean Sea. *Oscarella tuberculata* (A) and *Oscarella lobularis* (B).

**Fig.** 5. Spermatogenesis (A, B), oogenesis (C, D) and embryogenesis (E-G) in *Oscarella tuberculata* and *O. lobularis* (A) SEM image of peripheral part of spermatocyste. Intercellular bridge (arrow) is seen between two primary spermatocytes, inherited after the spermatogonia division. (B) Semi-thin micrographs of two spermatocyst with the different generation and composition of male germ cells. (C) Semi-thin micrographs of young oocyte in the mesihyl; (D) Semi-thin micrographs of mature egg surrounding by follicle (Fo). (E) Semi-thin micrographs of two embryos during multipolar egression. (F) SEM micrographs of coeloblastula in the sponge mesohyl. (G) SEM micrographs of cut cinctoblastula larva. Abbreviations: Bm - basal membrane; C – spermatic cyst, ChCh – choanocyte chambers, ExC – exhalant canal, F – sperm flagella, N – nucleus; Sc I – primary spermatocytes, St – spermatids; Sz – spermatozoid; Y – yolk granules.

**Fig. 6.** Histology images of *Oscarella tuberculata* (A, B) and *O. lobularis* (C, D) reproductive sponges. (A) Male sponge (July 2007) with the spermatocystes (Sp) in the choanosome; (B)

Female sponge (June 2006) with the embryos on different stages of development. (C) Male sponge (July 2007) with the spermasocystes (Sp) in the choanosome; (D) Female sponge (June 2006) with the embryos on different stages of development.

Fig. 7. Diagram of reproductive cycle of Oscarella tuberculata (A) and Oscarella lobularis (B).

**Fig. 8**. Diagram of the correlation of water temperature and the monthly reproductive efforts of male and female in *Oscarella tuberculata* (A, B) and *Oscarella lobularis* (C).

**Fig. 9**. Diagram of the correlation of water temperature and the annual reproductive efforts of male and female in *Oscarella tuberculata* (A, B) and *Oscarella lobularis* (C).

**Fig. 10.** Fluctuation of the temperature in the investigated area (Riou Island, 15m) from October 2001 to November 2003 (A) and from January 2006 to October 2008 (B).

# Figure 1:



Figure 2:















Figure 7:



Reproductive cycle of Oscarella tuberculata



Reproductive cycle of Oscarella loibularis



96





Figure 10:



*B.3* : Les Homoscléromorphes, la 4<sup>e</sup> lignée d'éponges. Apports de la phylogénie moléculaire associée aux caractères morphologiques

#### **B.3.1 : Présentation de l'article**

Les 7000 espèces d'éponges décrites sont classiquement réparties en trois classes Calcarea Bowerbank, 1864; Demospongiae Sollas, 1885; Hexactinellida Schmidt, 1870. Récemment, une 4<sup>e</sup> lignée d'éponges, les Homoscleromorpha (Dendy, 1905) a été proposée (Hooper *et al.*, 2002 ; Borchiellini *et al.*, 2004 ; Sperling *et al.*, 2007 ; Philippe *et al.*, 2009). Les homoscléromorphes présentent une grande variabilité de formes, mais leur organisation générale et leurs caractéristiques cytologiques et embryologiques relativement simples (qui sont de potentielles autapomorphies) semblent suggérer la monophylie de ce groupe (Muricy et Diaz, 2002). Jusqu'en 1995, deux familles étaient reconnues (Oscarellidae et Plakinidae) basées sur la présence ou l'absence de spicules. Cependant, la distinction d'un nouveau genre *Pseudocorticium* (Boury-Esnault *et al.*, 1995) avait conduit les auteurs à supprimer cette subdivision. Depuis lors, les homoscléromorphes sont considérées comme constituées d'une seule famille (Plakinidae), de sept genres et de 78 espèces (Van Soest *et al.*, 2008).

Les relations internes de trois grandes lignées d'éponges sur quatre ont été récemment étudiées *via* une approche de phylogénie moléculaire (pour les démosponges : (Borchiellini *et al.*, 2004 ; Nichols, 2005 ; Lavrov *et al.*, 2008), pour les calcaires (Manuel *et al.*, 2003a ; Dohrmann *et al.*, 2006), pour les hexactinellides (Dohrmann *et al.*, 2008). Notre étude avait donc pour but de tester la validité de la taxonomie actuelle au sein de la 4<sup>e</sup> et dernière lignée d'éponge, les homoscléromorphes. Pour cela, plusieurs marqueurs moléculaires ont été utilisés : les gènes codant pour les ADNr 18S et 28S ainsi que les génomes mitochondriaux complets et quelques caractères morphologiques, et ce pour une vingtaine d'espèces représentatives de six des sept genres décrits actuellement.

Nos résultats, globalement congruents pour tous les marqueurs (et toutes les méthodes d'analyses) ont permis dans un premier temps de retrouver une distinction robuste entre les genres contenant des espèces à spicules et les genres contenant des espèces sans spicules, validant ainsi ce caractère morphologique comme étant une synapomorphie morphologique. Nous avons ainsi proposé la restauration des deux anciennes familles : Oscarellidae et

Plakinidae. Cette distinction étant également soutenue par un arrangement des gènes du génome mitochondrial différent pour les deux clades. Nous avons également retrouvé la monophylie de certains genres (*Corticium*, et vraisemblablement *Plakinastrella*), la paraphylie du genre *Plakina* et certaines incertitudes perdurent en ce qui concerne les genres *Plakortis* et *Oscarella*. Les caractères morphologiques soutenant ces clades ont également été réévalués. Cette étude combine pour la première fois chez les éponges des données issues : de marqueurs nucléaires, des génomes mitochondriaux et des caractères morphologiques.

Ce travail dont je suis co-1<sup>er</sup> auteur fait l'objet d'un article de recherche qui sera soumis d'ici peu dans la revue Systematic Biology. Une version provisoire n'incluant pas les résultats obtenus grâce à l'étude des génomes mitochondriaux (à l'heure actuelle toujours en cours d'analyse par le Dr. Dennis V. Lavrov<sup>4</sup>) est présentée dans cette thèse.

# B.3.2 : Article 3: Molecular phylogeny restores the supra-generic subdivision of Homoscleromorph (Dendy, 1905) sponges.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Dr. Dennis V. Lavrov, EEOB, Iowa State University, USA

# Molecular phylogeny restores the supra-generic subdivision of Homoscleromorph (Dendy, 1905) sponges

Eve Gazave <sup>1\*</sup>, Pascal Lapébie <sup>1\*</sup>, Emmanuelle Renard <sup>1</sup>, Caroline Rocher <sup>1</sup>, Jean Vacelet <sup>1</sup>, Alexander V. Ereskovsky <sup>1,2</sup>, Dennis V. Lavrov <sup>3</sup> and Carole Borchiellini <sup>1§</sup>.

<sup>1</sup> Aix-Marseille Universités, Centre d'Océanologie de Marseille, Station marine d'Endoume - CNRS UMR 6540-DIMAR, rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille, France

<sup>2</sup> Department of Embryology, Faculty of Biology and Soils, Saint-Petersburg State University, Universitetskaja nab. 7/9, St Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Department of Ecology, Evolution, and Organismal Biology, Iowa State University, 343A Bessey Hall, Ames, IA 50011, USA

\*: Both authors contribute equally to this work

§: Corresponding autor

# Abstract

Homoscleromorpha are the fourth sponge lineage, recently considered as distinct from Demospongiae. They are classically considered to be composed of 7 genera based on morphological characters. Here we describe the first molecular phylogeny based on 18S and 28S rDNA, for this peculiar group, and investigate especially genus relationships. Our results show a clear distinction of two robust clades, one containing the genera with spiculated species and the other the genera with non-spiculated species, restoring an ancient supra-order classification. The evolution of morphological characters is discussed in the light of these molecular relationships.

Keywords: Homoscleromorpha, molecular phylogeny, characters evolution, Oscarellidae, Plakinidae.

## Introduction

Because they are widely considered to be the most ancient multicellular animals, the sponges (phylum Porifera) represent a pivotal group for understanding the origin and early evolution of Metazoa (Dewel, 2000 ; Borchiellini *et al.*, 2001 ; Muller et Muller, 2003 ; Maldonado, 2004 ; Nichols *et al.*, 2006 ; Philippe *et al.*, 2009). There are presently more than 7 000 described sponge species that are exclusively aquatic and predominantly filter-feeding animals. Traditionally, on the basis of body plan features, they were grouped in one phylum Porifera divided in three classes: Calcarea Bowerbank, 1864; Demospongiae Sollas, 1885; and Hexactinellida Schmidt, 1870. While recent phylogenetic studies fail to find obvious consensus concerning the monophyly *vs* paraphyly of Porifera and concerning their relationships relatively to other non-bilaterian metazoans (Philippe *et al.*, 2009 ; Sperling *et al.*, 2009), it clearly appears that Homoscleromorpha (Dendy, 1905), previously defined as part of Demospongiae, constitutes a fourth high level sponge taxon, alongside the three classically recognized (for recent references see (Sperling *et al.*, 2007 ; Dohrmann *et al.*, 2008 ; Philippe *et al.*, 2009). These results shed light onto this small sponge group so neglected until recently.

The classification of Homoscleromorpha as a family or a suborder of the subclass Tetractinellida in the class Demospongiae was due to the shared presence of siliceous tetractinal-like calthrops spicules (Lévi, 1956). Lévi (1973) later proposed to classify them as a distinct subclass in the Demospongiae (Lévi, 1973), rank maintained in the more recent and most generally admitted classification "Systema Porifera: a guide to the classification of sponges" (Hooper et van Soest, 2002). Since 2004, however, the pertainance of Homoscleromorpha to Demospongiae has been challenged by molecular studies (Borchiellini et al., 2004). In presently available analyses using a suitable sampling to test the phylogenetic position of homoscleromorphs, we can distinguish two alternative scenarios: (i) closer to eumetazoan than to the other sponges, resulting in the paraphyly of sponges (Borchiellini et al., 2004; Sperling et al., 2007; Peterson et al., 2008; Hejnol et al., 2009; Sperling et al., 2009) or (ii) as the sister-group of the calcareous sponges in agreement with the monophyly of Porifera (Dohrmann et al., 2008; Philippe et al., 2009). A shared ancestry of Homoscleromorpha and Calcarea has been suggested earlier by Van Soest (Van Soest, 1984), based on a slight similarity of spicule form and of larva type. However, these morphological characters were not convincing: indeed (i) the calthrop-like spicules are of a widely different

mineralogy (calcium carbonate versus silica) in the two taxa; (ii) furthermore, the analogy between their larva types was based only on the use of a similar term for larvae that are now considered as clearly different, respectively amphiblastula for Calcarea and cinctoblastula for Homoscleromorpha (Boury-Esnault *et al.*, 2003).

Homoscleromorphs are exclusively marine sponges, generally located in shallow waters from 8 to 60 m, but some species have been already found at more than 1000 m depth (Muricy et Diaz, 2002). All species are dwellers of hard substratum communities often in semi dark or dark conditions. Some species may only grow on coralligenous substratum. In some places, homoscleromorphs can be predominant and constitute particular facies. They seem to be strong competitors for space, overgrowing massive sponges, sea fans and erected bryozoans (Diaz et Van Soest, 1994 ; Muricy et Diaz, 2002 ; Ereskovsky *et al.*, 2009). Their fossil record probably dates back to the Early Carboniferous (Reid, 1970), and is documented in the Early and Upper Jurassic (Wiedenmayer, 1994). Homoscleromorph sponges appear as a promising sponge group in marine natural product research, with several species offering a high secondary metabolite diversity with potential value for the biomedical field (Kornprobst, 2005).

Homoscleromorpha have a great variability of forms but their general organization and the basic characteristics of their cytology and embryology, as potentially autapomorphic characters, argue for the monophyly of this group. This sponge clade is characterized by an aquiferous system of either sylleibid-like or leuconoid organization with eurypylous, diplodal or aphodal choanocyte chambers. As far as skeletal structures are concerned, when siliceous spicules are present, they harbor a peculiar type (calthrops and its derivates) and do not form a well-organized skeleton. Homoscleromorpha possess flagellated exopinacocytes- and endopinacocytes, a peculiar flagellated apopylar cells, a cinctoblastula larva, a basement membrane underlying both choanoderm and pinacoderm, and zonula adhaerens cell junctions in adults and larval epithelia, cross-striated ciliar rootlet in larvae and unique for sponges asynchronous spermatogenesis (for review see (Muricy et Diaz, 2002 ; Ereskovsky *et al.*, 2009) and Figure 1).

Until 1995, two families were currently recognized, Plakinidae Schulze, 1880 and Oscarellidae Lendenfeld, 1887, distinguished by the presence and absence of skeleton. But the description of the genus *Pseudocorticium* (Boury-Esnault *et al.*, 1995) led to discard this suprageneric classification and to merge all genera into a single family (Boury-Esnault *et al.*, 1995). Indeed, *Pseudocorticium* is devoid of mineral skeleton, like the genus *Oscarella*, but

presents closer affinity in histological traits (notably the aquiferous system) with the skeletal genus *Corticium*. Thus Homoscleromorpha are presently considered to contain a single family Plakinidae Schulze, 1880, including 7 genera (*Oscarella* Vosmaer, 1887; *Plakina* Schulze, 1180; *Plakortis* Schulze, 1180; *Plakinastrella* Schulze, 1180; *Corticium* Schmidt 1862; *Pseudocorticium* Boury-Esnault et al., 1995; *Placinolopha* Topsent, 1897a) and about 78 species. Genera are distinguished mainly by four morphological characters (Diaz et Van Soest, 1994; Boury-Esnault *et al.*, 1995; Muricy et Diaz, 2002): the presence or absence of a siliceous skeleton; the presence or absence of a cortex associated with the architecture of the aquiferous system and type of choanocytes chambers; if spicule are present, the number of spicule size classes and the presence and type of ramification in the actins of calthrops.

Internal relationships within three of the four major sponge groups have recently been investigated with molecular phylogenetic approaches (Calcispongia by (Manuel *et al.*, 2003a ; Dohrmann *et al.*, 2006) ; Demospongiae by (Borchiellini *et al.*, 2004 ; Nichols, 2005) ; and Hexactinellida by (Dohrmann *et al.*, 2008)). Since Homoscleromorpha were only recently recognized as a separated, high level sponge clade, their internal relationships were not investigated so far. Concerning both their potential usefulness in the pharmacological field and the recent emergence of two *Oscarella* species as models in the evo-devo field - *O. lobularis* and *O. carmela* - , a reevaluation of phylogenetic relationships using molecular markers inside Homoscleromorpha seems necessary. This paper presents the first study testing Homoscleromorpha classification schemes proposed in the literature *via* the integration of 18S rDNA and 28S rDNA data. Our goals were to test the two competing hypotheses for their broadest subdivision, to test genus validity and to formulate hypotheses concerning morphological character evolution within the group.

# **Material and Methods**

#### 1) Specimen collection

Specimens were collected in scuba diving mostly by A.V.E or provided to us by colleagues (see Acknowledgments part). The species used in this study, their current taxonomic status and their sequence accession numbers are summarized in Table 1. The identification of all specimens used in this study has been carefully checked using morphological characters by the taxonomists of our team (JV and AVE).

#### 2) Ribosomal sequences acquisition

Procedures used for genomic DNA extraction, cloning and DNA sequencing are described in (Borchiellini *et al.*, 2001), except for a few DNA extractions realized with the QIA amp DNA mini kit (DNA purification from tissues, Qiagen), following the manufacturer instructions, instead of the Promega's one.

Amplification primers for full-length/partial 18S and partial 28S ribosomal DNA (rDNA) are given in Table 2. Reaction mixes were adapted from Borchiellini et al. (2001). Most 18S and 28S amplicons were obtained by nested PCR with different combinations of primers depending of the species concerned. Thermocycling was carried out using mostly "touchdown" protocols with annealing temperatures ranging from 65°C to 45°C, (depending on melting temperature of primers) and a range of cycles from 30 to 45 were performed.

Despite substantial efforts, we were not able to obtain 18S/28S sequences for some species (especially a *Placinolopha* species), and in some cases only shorter sequences could be amplified (see Table 1 for distribution of missing data).

#### 3) Choice of outgroup

Outgroup sequences were downloaded from GenBank (Table 3). To achieve a reasonable trade-off between representativeness of outgroup taxa and ease of alignment, and because our prime interests were relationships within Homoscleromorpha, we restricted our sampling to sponges and included only a few members of two other key sponge groups (Calcarea and Demospongiae). One Calcinea, two Calcaronea and two Halichondrida were added to our Homoscleromorpha sampling.

#### 4) Sequence alignments and phylogenetic analysis

Initial sequence alignment was performed using the online software Muscle (<u>http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html</u>) (Edgar, 2004a, 2004b), then subsequently optimised by eye on Bioedit Sequence Alignment Editor 5.09 (Hall, 1999). Ambiguously aligned regions were determined by the program Gblocks version 0.91 b (Castresana, 2000), and excluded from the analyses. After trying a variety of settings, the final Gblocks settings were selected to yield a good quality alignment while not sacrificing an unnecessarily large amount of data. A removal of 91%, and 87% of the 18S and 28S alignments, respectively, was thus performed. The settings were the following for the 18S rRNA and 28S rRNA partitions respectively: [1: 12; 2: 18; 3: 10; 4: 8; 5: all]; [1: 12; 2: 12; 3: 8; 4: 3; 5: with half]. The character exclusion sets based on Gblocks are available upon request through the corresponding author.

The 18S and 28S alignments have been deposited on the free TreeBASE database (www.treebase.org).

Phylogenetic analyses were performed using parsimony, distance, Maximum Likelihood (ML) and Bayesian methods.

We used PAUP 4.0 (Swofford, 2000) for parsimony and distance phylogenetic analyses. Distance analyses were performed using Neighbour-Joining (NJ) with distances corrected by Kimura's two-parameter model. For Maximum Parsimony (MP) analyses, characters were always treated as unordered and equally weighted (contrary to Bayesain analyses). MP trees were computed using heuristic searches with 100 replicates of random taxon addition sequence and TBR branch swapping.

For ML analyses we used MrModeltest (modified version of ModelTest 3.6) (Posada et Crandall, 1998 ; Nylander, 2004) to determine the best-fitting nucleotide substitution model for each data partition, excluding ambiguously aligned regions from the calculations. This resulted in the following model being used for 18S and 28S: GTR + G + I (general time-reversible model + gamma shape distributed rates of substitution + estimated proportions of invariant sites). Then, we performed the analyses with the phyML software (Guindon and Gascuel 2003). Parameters were set by using MrModeltest. Between site variation was estimated using a discrete approximation of the gamma distribution with 4 rate categories. Gaps were treated as missing data. The statistical robustness of the tree topology was assessed by bootstrap resampling (1000 replicates for NJ and MP and ML).

Bayesian analysis (BI) was performed with MrBayes 3.1 (Huelsenbeck et Ronquist, 2001) with the nucleic acid models previously determined by MrModelTest (Nylander, 2004) (citer models). Two sets of four independent simultaneous Metropolis-couples Markov chains Monte Carlo were run for 1 million generations and sampled every 1000 generations and we used a 25% burn-in (of tree and parameters). The runs were monitored for convergence and the average standard deviation of split frequencies obtained were as followed: 0.005 and 0.004, for respectively, 18S and 28S datasets.

Bayesian posterior probabilities (PP) were used for assessing the confidence value of each node. Lacking positions were scored as missing data.

Given that bootstrap proportion values (BP values) are a conservative measure of a clade support (Hillis et Bull, 1993) and Bayesian posterior probabilities (PP values) might be overestimated (Huelsenbeck et Rannala, 2004), PP values >95% and BP values >75% were interpreted as giving significant support to the respective clades.

# Results

#### Nuclear markers 18S and 28S ribosomal SU genes

The results obtained by the 18S and 28S using the different phylogenetic methods were mostly congruent. We chose to present the topologies obtained by ML method for each marker, indicating for each node the support found by the different methods (Figure 2 and 3). All the other trees obtained by the different methods are available upon request.

First of all, even if our sampling was not designed to fully test the monophyly of Homoscleromorpha, the obtained topologies are all in accordance with the monophyly of this group as previously reported (Borchiellini *et al.*, 2004 ; Lavrov *et al.*, 2008 ; Sperling *et al.*, 2009), whatever the relationships found between outgroup species (Demospongiae and Calcarea) that differ according to markers or methods used.

Homoscleromorpha are divided into two clades supported by maximum BP and PP values (from 96 to 100 for BP and PP=1.00): one groups *Pseudocorticium* and *Oscarella* genera

(clade A) while the other groups *Corticium*, *Plakina*, *Plakinastrella* and *Plakortis* genera (clade B).

Inside clade A, the monophyly of the genus *Oscarella* depends on the fluctuating position of *O. microlobata* grouping either with other *Oscarella* species or with *Pseudocorticium*. We can note the longer branch leading to *O. microlobata* that suggests that this unstable position may be due to long branch attraction (LBA) artefact. Between the three other analyzed species of the *Oscarella* genus *O. malakhovi* and *O. carmela* are closer to each other (maximum BP and PP in all analyses) than they are from *O. lobularis*.

Inside clade B, the three species of the genus *Corticium* form a highly supported monophyletic group (clade B1 supported by robust values from 96 to 100 for BP and PP=1.00), where the two south Pacific species are sister groups. The four species belonging to *Plakortis* and *Plakinastrella* genera always group together, in a robust clade B2 (BP from 87 to 100 and maximum PP). In this clade B2, the two *Plakinastrella* species are grouped (maximum PP and BP) while the relative position of the two species of the *Plakortis* genus is unresolved. These relationships are thus congruent with the monophyly of the genus *Plakinastrella* whereas the monophyly of the genus *Plakortis* would have to be further tested. As far as the species pertaining to the genus *Plakina* are concerned, they do not form a clade: on the one hand *P. trilopha* and *P. jani* form a highly supported group (clade B3 supported by maximum PP value and BP values from 96 to 100), on the other hand *P. monolopha* and *P. crypta* have a weaker affinity to one another (clade B4 not supported).

# Discussion

#### The position of Pseudocorticium genus and the restoration of two families

In 1995, Boury-Esnault *et al.* described a new genus, *Pseudocorticium*. The name of this genus was chosen according to the presence of a cortex similar to that found in the *Corticium* genus. Our molecular analyses, based on nuclear markers, highly support a relatedness of *Pseudocorticium* with the genus *Oscarella* instead of *Corticium*. In other words, this results in the subdivision of Homoscleromorpha into two clades (A and B): one grouping species devoid of spicules (clade A: *Pseudocorticium* and *Oscarella*), the other corresponding to spiculated species (clade B: *Plakina, Plakortis, Plakinastrella* and *Corticium* genera) (Figure
4). This finding has various implications both on the classification of Homoscleromorpha and on the understanding of character evolution.

The first consequence is that this molecular study is congruent with the subdivision of homoscleromorphs into two families Oscarellidae Lendenfeld, 1887 (corresponding to clade A minus the Pseudocorticium genus that was described latter) and Plakinidae Schulze, 1880 (corresponding to clade B), as admitted until 1995 on the basis of absence/presence of mineral skeleton (respectively). From a morpho-anatomical point of view, this suggests that spicules may have appeared once in the last common ancestor (LCA) of Plakinidae, or alternatively the spicules could have been ancestral and secondary lost in Oscarellidae.Regarding, available data on spicule evolution, even if the second scenario isphylogenetically less parcimonious, both hypotheses are credibles. This also implicates that the similar cortex, aquiferous system organization and outer morphological similarity encountered in both Corticium and Pseudocorticium represent homoplasic characters. Our results exclude the possibility that Pseudocorticium could be an aspiculate morph of Corticium, unable to secrete spicules in an environment poor in silica, a case that has been evidenced for some demosponges (Maldonado et al., 1999) and suggested previously for this genus (Boury-Esnault et al., 1995). It is worth noticing that our analyses contradict a previous study based on allozyme comparison has suggested that Pseudocorticium jarrei (mentioned as Corticium sp. in the paper) is more related to Corticium candelabrum than to Oscarella lobularis and O. tuberculata (Solé Cava et al., 1992). Nevertheless, the authors also showed in this study that Oscarella tuberculata appeared more closely related to Corticium species than to O. lobularis, that led us to be doubtful about the resolution power of allozymes for this issue.

#### The common origin of Plakinastrella and Plakortis genera

Our study shed lights on the relatedness of *Plakortis* and *Plakinastrella*. The affinity between these two genera was never proposed by earlier morphological studies. Nevertheless, it is worth noticing that this clade is supported by a morphological synapomorphy. Indeed, in both genera, lophose spicules are absent, contrary to all the other spiculated genera, that possess at least one lophose spicule type (Figure 4). The two genera remain, nevertheless, distinct. *Plakortis* has diods and triods in a one size class, whereas, *Plakinastrella* owns diods, triods and/or calthrops of several size classes (Muricy et Diaz, 2002). In all our analyses based on three species, *Plakinastrella* is monophyletic, thus, the combination of those spicules is a valid morphological character to define this genus. Concerning the *Plakortis* genus, we cannot

conclude as in our analyses it appears to be either monophyletic or paraphyletic. Nevertheless, the presence of spicular characters, which appear robust, may favor the hypothesis of monophyly, although molecular phylogeny including more species will be necessary to firmly conclude.

#### The challenging of the Plakina genus: need of substantial nomenclature revision

It seems that the presence of spicules in some homoscleromorph genera has previously led not only to their incorrect assignation to Demospongiae but also led to a doubtful definition of the genus *Plakina*. This genus is defined by "a spiculation of diods, triods and calthrops in a single size class, and with homolophose calthrops with, one, two three or four lophate rays". In other words, species that do not contain a heterolophose calthrop specific of *Corticum* has been considered to pertain to the genus *Plakina*. Furthermore, several authors have previously recognize that this genus, which shares with *Corticium* some spicule similarities, is likely to be paraphyletic (Muricy *et al.*, 1996 ; Muricy *et al.*, 1998 ; Muricy *et Diaz*, 2002). Our results confirm clearly that the genus is a polyphyletic group. This implicates that the allegedly intraspecific variability in morphological characters in this genus (Muricy *et al.*, 1998) is in fact certainly due to the presence of several different genera. After a larger dataset analysis, the genus *Plakina* will have to be redefined and other genera to be described. One of them could contain *Plakina jani* and *P. trilopha* that are characterized by the presence of a well developed mesohyl and a tetralophose calthrop (type of spicule absent in the other "*Plakina*" included in our study (Figure 4).

#### **Conclusions and perspectives**

Finally, this first molecular phylogenetic analysis aiming at testing relationships inside the Homoscleromorpha clade confirmed an old distinction between spiculated and non spiculated species. Nevertheless it pointed out doubts or inconsistencies concerning previously described genera that will have to be unraveled. This should motivate further molecular studies in order to be able to renew the taxonomy of the group.

First the relationships between *Pseudocorticium* and *Oscarella* genera are not resolved in this paper. A more detailed study of these two genera is actually in progress in our laboratories. Indeed, this point is expected to lead to substantial taxonomic changes: depending on the results we will obtain, this may implicate the renaming of *Pseudocorticium* into *Oscarella*,

the redefinition of Oscarellidae or to propose a new name for the group composed of *Oscarella* and *Pseudocorticium* genera. As far as spiculated species are concerned *Plakortis* and *Plakina* genera monophyly will have to be better tested by an appropriate sampling.

## Acknowledgements

Robert Thacker, Paco Cardenas, Guilherme Muricy, Friederike Hoffmann, Hans Tore Rapp, John Hooper, Jane Fromont, Shirley Pomponi, Cécile Debitus, Sylvain Petek, Andrew Han, Margo Haygood are thanked for providing specimens.

Special thank to Merrick Ekins, the Collection Manager of Sessile Marine Invertebrates Biodiversity program, in the Queensland Museum (Australia) for providing several specimens. We gratefully acknowledge several students that help us in lab work.

- Borchiellini, C., Chombard, C., Manuel, M., Alivon, E., Vacelet, J., Boury-Esnault, N. 2004. Molecular phylogeny of Demospongiae: implications for classification and scenarios of character evolution. *Molecular phylogenetics and evolution* 32, 823-837.
- Borchiellini, C., Manuel, M., Alivon, E., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Le Parco, Y. 2001. Sponge paraphyly and the origin of Metazoa. *Journal of Evolutionary Biology* 14, 171-179.
- Boury-Esnault, N., Ereskovsky, A. V., Bezac, C., Tokina, D. B. 2003. Larval development in Homoscleromorpha (Porifera, Demospongiae). *Invertebrate Biology* 122, 187-202.
- Boury-Esnault, N., Muricy, G., Gallissian, M. F., Vacelet, J. 1995. Sponges without skeleton: a new Mediterranean genus of Homoscleromorpha (Porifera, Demospongiae). Ophelia 43, 25-43.
- **Castresana, J.** 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular biology and evolution* 17, 540-552.
- **Dewel, R. A.** 2000. Colonial origin for Emetazoa: major morphological transitions and the origin of bilaterian complexity. *J Morphol* 243, 35-74.
- Diaz, M. C., Van Soest, R. W. M. (Eds.) 1994. The Plakinidae: a systematic review. A.A. Balkema, Rotterdam.
- **Dohrmann, M., Janussen, D., Reitner, J., Collins, A. G., Worheide, G.** 2008. Phylogeny and evolution of glass sponges (porifera, hexactinellida). *Systematic biology* 57, 388-405.
- **Dohrmann, M., Voigt, O., Erpenbeck, D., Worheide, G.** 2006. Non-monophyly of most supraspecific taxa of calcareous sponges (Porifera, Calcarea) revealed by increased taxon sampling and partitioned Bayesian analysis of ribosomal DNA. *Molecular phylogenetics and evolution* 40, 830-843.
- Dunn, C. W., Hejnol, A., Matus, D. Q., Pang, K., Browne, W. E., Smith, S. A., Seaver, E., Rouse, G. W., Obst, M., Edgecombe, G. D., Sorensen, M. V., Haddock, S. H., 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*.
- Edgar, R. C. 2004a. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics* 5, 113.
- Edgar, R. C. 2004b. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32, 1792-1797.

- Ereskovsky, A. V., Borchiellini, C., Gazave, E., Ivanisevic, J., Lapebie, P., Perez, T., Renard, E., Vacelet, J. 2009. The Homoscleromorph sponge *Oscarella lobularis*, a promising sponge model in evolutionary and developmental biology. *Bioessays* 31, 89-97.
- Hall, T. A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser* 41, 95-98.
- Hejnol, A., Obst, M., Stamatakis, A., Ott, M., Rouse, G. W., Edgecombe, G. D., Martinez, P., Baguna, J., Bailly, X., Jondelius, U., Wiens, M., Muller, W. E., Seaver, E., Wheeler, W. C., Martindale, M. Q., Giribet, G., Dunn, C. W. 2009. Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*.
- Hillis, D. M., Bull, J. J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic biology* 42.
- Hooper, J. N., Van Soest, R. W. M., Debrenne, F. (Eds.) 2002. Phylum Porifera Grant, 1836; Systema Porifera: A Guide to the classification of Sponges. *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, New York.
- Hooper, J. N. A., van Soest, R. W. M. (Eds.) 2002. Class Demospongiae Sollas, 1885, Systema Porifera: A Guide to the classification of Sponges. *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, New York.
- Huelsenbeck, J., Rannala, B. 2004. Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. *Systematic biology* 53, 904-913.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics (Oxford, England)* 17, 754-755.
- Kornprobst, J. M. (Ed. 2005. Spongiaires (Eponges). Lavoisier, Paris.
- Lavrov, D. V., Wang, X., Kelly, M. 2008. Reconstructing ordinal relationships in the Demospongiae using mitochondrial genomic data. *Molecular phylogenetics and evolution* 49, 111-124.
- Lévi, C. 1956. Etude des Halisarca de Roscoff. Embryologie et systématique des démosponges. Archives de Zoologie expérimentale et générale 93, 1-184.
- Lévi, C. (Ed. 1973. Systématique de la classe des Demospongiaria (Démosponges). Masson & Compagnie, Paris.
- Maldonado. 2004. Choanoflagellates, choanocytes, and animal multicellularity. *Invertebrate Biology* 123, 1-22.

- Maldonado, M., Carmona, M. C., Uriz, M. J., Cruzado, A. 1999. Decline in Mesozoic reef-building sponges explained by silicon limitation. *Nature* 401, 785-788.
- 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. *Systematic biology* 52, 311-333.
- Muller, W. E., Muller, I. M. 2003. Analysis of the sponge [Porifera] gene repertoire: implications for the evolution of the metazoan body plan. *Prog Mol Subcell Biol* 37, 1-33.
- Muricy, G., Boury-Esnault, N., Bézac, C., Vacelet, J. 1998. Taxonomic revision of the Mediterranean *Plakina* Schulze (Porifera, Demospongiae, Homoscleromorpha). *Zoological Journal of the Linnean Society* 124, 169-203.
- Muricy, G., Diaz, M. C. (Eds.) 2002. Order Homosclerophorida Dendy, 1905, Family Plakinidae Schulze, 1880. *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, New-York.
- Muricy, G., Solé Cava, A. M., Thorpe, J. P., Boury-Esnault, N. 1996. Genetic evidence for extensive cryptic speciation in the subtidal sponge *Plakina trilopha* (Porifera: Demospongiae: Homoscleromorpha) from the Western Mediterranea. *Marine Ecology Progress Series* 138, 181-187.
- Nichols, S. A. 2005. An evaluation of support for order-level monophyly and interrelationships within the class Demospongiae using partial data from the large subunit rDNA and cytochrome oxidase subunit I. *Molecular phylogenetics and evolution* 34, 81-96.
- Nichols, S. A., Dirks, W., Pearse, J. S., King, N. 2006. Early evolution of animal cell signaling and adhesion genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 12451-12456.
- Nylander, J. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Peterson, K. J., Cotton, J. A., Gehling, J. G., Pisani, D. 2008. The Ediacaran emergence of bilaterians: congruence between the genetic and the geological fossil records. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 363, 1435-1443.
- Philippe, H., Derelle, R., Lopez, P., Pick, K., Borchiellini, C., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Renard, E., Houliston, E., Queinnec, E., Da Silva, C., Wincker, P., Le Guyader, H., Leys, S., Jackson, D. J., Schreiber, F., Erpenbeck, D., Morgenstern,

**B.**, Worheide, G., Manuel, M. 2009. Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships. *Current Biology* 19, 706-712.

- Posada, D., Crandall, K. A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics (Oxford, England) 14, 817-818.
- Reid, R. E. H. (Ed. 1970. Tetraxons and demosponge phylogeny. Academic Press, London.
- Solé Cava, A. M., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Thorpe, J. P. 1992. Biochemical genetic divergence and systematics in sponges of the genera Corticium and Oscarella (Demospongiae: Homoscleromorpha) in the Mediterranean Sea. *Marine Biology* 113, 299-304.
- Sperling, E. A., Peterson, K. J., Pisani, D. 2009. Phylogenetic-signal dissection of nuclear housekeeping genes supports the paraphyly of sponges and the monophyly of Eumetazoa. *Molecular biology and evolution* 26, 2261-2274.
- Sperling, E. A., Pisani, D., Peterson, K. J. (Eds.) 2007. Poriferan Paraphyly and its Implications for Precambrian Paleobiology. *Geological Society*, London.
- 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.
- Swofford, D. L. (Ed. 2000. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods), Sunderland, Massachusetts.
- Van Soest, R. W. M. 1984. Deficient Merlia normani Kirkpatrick, 1908, from the Curacao reefs, with a discussion on the phylogenetic interpretation of sclerosponges. . Bijdragen tot de Dierkunde 54, 211-219.
- Van Soest, R. W. M., Boury-Esnault, N., Hooper, J. N. A., Rützler, K., de Voogd, N. J., Alvarez, B., Hajdu, E., Pisera, A. B., Vacelet, J., Manconi, R., Schoenberg, C., Janussen, D., Tabachnick, K. R., Klautau, M. 2008. World Porifera database <u>http://www.marinespecies.org/porifera</u>.
- Wiedenmayer, F. 1994. Contributions to the knowledge of post-palaeozoic neretic and archibenthal sponges (Porifera): The stratigraphic record, ecology, and global distribution of intermediate and higher taxa. . Schweizerische Paläontologische Abhandlungen 116, 1-147.

#### Legends figures and tables

Fig. 1: A few relevant morphological characters in the Homoscleromorpha. (A, B) Spicules of the Homoscleromorpha (SEM). A: d – diod of *Plakina trilopha* (Marseille, Mediterranean); t - triod of *Plakortis simplex* (Marseille, Mediterranean); c - calthrop of P. trilopha (Marseille, Mediterranean). B: tc – tetralophose calthrop of *Plakina weinbergi* (Mediterranean, Liban); hc - heterolophose caltrops (candelabra) of Corticium candelabrum (Adriatic Sea). C -Oscarella kamchatkensis (Avacha Bay, Bering Sea, Russia), transverse semi-thin section showing the sylleibid aquiferous system with eurypylous choanocyte chambers (cc); D -Pseudocorticium jarrei (Marseille, Mediterranean) transverse semi-thin section showing the leuconoid aquiferous system with diplodal choanocyte chambers (cc). E - Oscarella malakhovi (Japan Sea, Russia) SEM micrograph of the flagellated exopinacoderm with ostium (o). F - Oscarella viridis (Marseille, Mediterranean) TEM micrograph showing basement membrane (arrow heads) underlining the endopinacocytes (en) and choanocytes (ch). G - Corticium candelabrum (Marseille, Mediterranean) transverse semi-thin section of cinctoblastula larva, showing anterior (ap) and posterior (pp) poles. H - Plakina trilopha TEM micrograph of the cross-striated ciliar rootlet (arrows). I - Oscarella microlobata (Marseille, Mediterranean) TEM micrograph of cell junctions (zonula adhaerens) between the ciliated cells of cinctoblastula larva (arrows).

Abbreviations: b – symbiotic bacteria; ec – ectosome; n – nucleus; o – ostium.

**Fig. 2:** Phylogramm showing the relationships among the six genera of Homoscleromorpha based on 18S rDNA analyses. The topology presented corresponds to the ML analysis. The outgroups are in green (Calcarea) and yellow (Demospongiae). The Homoscleromorpha species are split in two robust clades: A (pink) and B (blue). The four numbers are from top to bottom: bootstrap values for NJ, ML, MP and posterior probabilities for BI. Bootstraps (BP) (>50) and posteriors probabilities (PP) values are indicated for principals nodes.

**Fig. 3:** Phylogramm showing the relationships among the six genera of Homoscleromorpha based on 28S rDNA analyses. The topology presented corresponds to the ML analysis. The outgroups are in green (Calcarea) and yellow (Demospongiae). The Homoscleromorpha species are split in two robust clades: A (pink) and B (blue). The four numbers are from top to bottom: bootstrap values for NJ, ML, MP and posterior probabilities for BI. Bootstraps (>50) and posteriors probabilities values are indicated for principals nodes.

Fig.4: Simplified consensus tree showing the genus relationships in Homoscleromorpha based on molecular phylogeny. Morphological characters that are synapomorphies of these

clades are mapped. I: Absence of spicules in clade A. II: Presence of spicules (lophate and alophate) in clade B. III: Presence of a candelabre (heterolophose calthrope) specific of *Corticium* genus, clade B1. IV: Presence of alophose spicule and absence of lophose spicules in clade B2. V: Presence of tetralophose calthrope and of a well developed mesohyl in clade B3.

**Table 1:** List of species used in this work following the classification of Systema Porifera (Hooper *et al.*, 2002) and the recent updating undertaken in the World Porifera Database (Van Soest *et al.*, 2008). The collection site, the GenBank number of the 18S and 28S rDNA sequences and the references link to the sequences are indicated. In the sequences column, the new sequences are mentioned as "New".

 Table 2: List of primers' names and sequences used in this study, for 18S and 28S amplifications.

**Table 3:** Outgroup species included in the analyses, following the classification of Systema Porifera (Hooper *et al.*, 2002). The GenBank number of the 18S and 28S rDNA sequences are indicated.

<b>T 1</b>	
<b>Figure</b>	•
riguit	1.



Figure 2:



Figure 3:



Figure 4:



## Table 1:

			Genbank n° - 18S	Genbank n° - 28S	Collection site
Plakinidae					
	Oscarella	Vosmaert, 1877			
	Oscarella lobularis	(Schmidt, 1862)	New	New	Coral Cave, Marseilles, France
	Oscarella carmela	Muricy & Pearce, 2004	EU702422	EF654519	Carmel Bay, California, USA
	Oscarella malakhovi	Ereskovsky, 2006	New	New	Vostok Bay, Japan Sea, Russia
	Oscarella microlobata	Muricy et al. 1996	New	New	Jarre Cave, Marseilles, France
	Pseudocorticium	Boury- Esnault <i>et al.</i> , 1995			
	Pseudocorticium jarrei	Boury- Esnault <i>et al.</i> , 1995	New	New	Jarre Cave, Marseilles, France
	Corticium	Schmidt, 1862			
	Corticium candelabrum	Schmidt, 1862	New	New	Coral Cave, Marseilles, France
	Corticium sp1	n/a	New	New	Ngedesakr Channel, Palau
	Corticium sp2+	n/a	New	New	Vanuatu
	Plakortis	Schulze, 1880			
	Plakortis simplex	Schulze, 1880	AY348884	New	3 PP cave, La Ciotat, France
	Plakortis halichondroides	(Wilson, 1902)	New	New	Bocas del Toro, Panama
	Plakina	Schulze, 1880			
	Plakina jani	Muricy et al. 1996	New	New	Jarre Cave, Marseilles, France
	Plakina crypta	Muricy et al. 1996	New	New	3 PP cave, La Ciotat, France
	Plakina trilopha	Lendenfeld, 1907	New	New	Jarre Cave, Marseilles, France
	Plakina monolopha	Schulze, 1880	New	New	Thau pond, Sète, France
	Plakinastrella	Schulze, 1880			
	Plakinastrella onkodes	(Uliczka, 1929)	New	New	Bocas del Toro, Panama
	Plakinastrella spx *	n/a	EU702423		Looe Keys, Florida, USA
	Plakinastrella sp1 2677	n/a	pending		Outer Gneerings, Sunshine Coast. Queensland, Australia
	Plakinastrella sp2 3269	n/a		New	Holmes Reef, Coral Sea. Queensland, Australia

\* This species has been previously misidentified as *Plakortis angulospiculatus* and published under this name.

+ This species has been previously misidentified as *Corticium candelabrum* but morphological and molecular

characters refute that. n/a: not available

## Table 2:

Gene	Primer name	Sequence (5'-3')	References
18 S	(F) S1	AAC CTG GTT GAT CCT GCC A	Borchiellini et al., 2001
	(R) S2	TGC AGG TTC ACC TAC AGA A	Borchiellini et al., 2001
	(F) D	ACT GTG AAA CTG CGA ATG GCT C	This study
	(R) G	CAC CTA CGG AAA CCT TGT TAC GCA	This study
	18SHomo F	GYG AAA CTG CGA ATG GCY C	This study
	18SHomo R	CTT GTT ACG ACT TTT ACY TCC TC	This study
285	(F) X	GAA AAG AAC TTT GRA RAG AGA GT	Borchiellini et al., 2004
	(R) S2	ATK CGY TTC CCT CCY AAC GG	This study
	(F) S1	AGT CTT TCG CCC CTA TAC CCA	This study
	(R) Y	ACCCGCTGAATTTAAGCAT	Borchiellini et al., 2004
	28SHomo F1	CAT ATC AAT AAG CGG AGG AA	This study
	28SHomoF2	GAG TCG GGT TGT TTG GGA	This study
	28SHomoR	ATC GAT TTG CAC GTC AGA	This study

# Table 3:

		Genbank n° - 18S	Genbank n° - 28S
Demospongiae			
	Halichondrida		
	Axinella corrugata	AY737637	AY864741
	Ptilocaulis walpersi	AY737638	AY864743
Calcarea	Calcinea		
	Leucetta microraphis	AM180965	AM180995
	Calcaronea		
	Syconessa panicula	AM180976	AM181007
	Leucosolenia sp.	AF100945	AY026372



# C] Avantages et limites du modèle Oscarella lobularis

C.1 : Récolte, maintien et développement en aquarium des spécimens adultes

Cette partie de ma thèse s'est faite majoritairement en collaboration étroite avec le professeur Alexander Ereskovsky<sup>5</sup>, lors de son séjour de deux ans dans notre laboratoire suite à l'obtention d'une bourse Marie Curie.

Des fragments de spécimens adultes d'*Oscarella lobularis* ont été récoltés tout au long de ma thèse, en plongée sous-marine. Ils ont essentiellement été prélevés au site de la grotte à corail (Ile Maïre) par environ 15 m de profondeur (Figure 20). Il est cependant à noter que notre modèle est également présent dans la grotte d'Endoume, accessible en apnée et située à proximité de la station marine d'Endoume. Après prélèvement, les échantillons sont conservés dans l'eau de mer dans une glacière afin de ne pas leur faire subir de chocs thermiques pendant le transport. Les prélèvements ont été effectués pendant plusieurs mois à raison de une fois par mois en hiver et de une1 fois par semaine pour les périodes supposées de reproduction de l'éponge (Août/Septembre) et ce, afin de préciser le cycle de vie de cette espèce (voir partie II B.2). Des prélèvements ponctuels ont également eu lieu afin d'obtenir des individus en reproduction pour les expériences de morphogenèse chez l'adulte : régénération ou réaggrégations cellulaires.

Après récolte, les échantillons sont généralement nettoyés minutieusement afin d'enlever les organismes épibiontes qui sont très fréquents chez les éponges. En fonction des expériences, les échantillons suivent alors des traitements différents. Certains sont découpés en fragments et congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C pour les extractions d'ARN. D'autres sont fixés au paraformaldéhyde (PAF) et stockés dans le méthanol 100 % à -20°C pour les expériences d'hybridation *in situ*. Pour les expériences d'immunohistochimie, les échantillons sont fixés dans l'éthanol 100 %. Lors d'expériences nécessitant le maintien en vie pendant un laps de temps donné (comme les expériences d'inhibitions chimiques), les échantillons ont été placés dans les aquariums de la station ou dans une chambre thermostatée. Il est cependant à noter que la survie de cette espèce en aquarium reste limitée à quelques semaines et ce malgré

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Department of Embryology, Faculty of Biology and Soils, St-Petersburg University, Russia



Figure 21 : (A) Coupe histologique d'un individu d'*Oscarella lobularis* en reproduction, montrant les embryons et les pré-larves dans les tissus adultes. (B) La larve nageuse cinctoblastula d'*Oscarella lobularis*, la zone plus foncée représente le pole postérieur (rose). (C) Les différents types de formation du stade rhagon lors de la métamorphose des larves d'*Oscarella lobularis*. a : larve cinctoblastula ; b-b2 : invagination basale ; c1-c2 : « ring-like » invagination basale ; d-d3 : extension des côtés de la post-larve ; e : rhagon. Pp : cellules du pôle postérieure, Ap : cellules du pôle antérieur, Pl : cellules latéropostérieures, Al : cellules antéropostérieures, If : bourrelet interne de la post-larve (Ereskovsky *et al.*, 2007). (D) Rhagon *in vitro* obtenu lors de nos expériences de métamorphoses.

le renouvellement constant d'eau de mer dans les aquariums. Pour une raison encore inconnue, au bout d'une quinzaine de jours, les tissus perdent de leur consistance et nécrosent.

## C.2: Manipulations embryologiques

Les embryons et pré-larves d'*Oscarella lobularis* sont situés à l'intérieur des tissus de l'éponge adulte, à la base des lobes (Figure 21A). Quand les larves sont matures, elles sont relâchées dans l'eau de mer *via* les oscules de l'éponge (Figure 21B). Seules les larves matures peuvent donc être extraites des tissus maternel à des fins expérimentales, les embryons ne sont accessibles que sur coupe d'individus en reproduction. Durant la période supposée de reproduction d'*Oscarella*, après prélèvement dans le milieu des spécimens, ceuxci sont minutieusement observés à la loupe binoculaire afin de savoir s'ils sont effectivement en reproduction. Si c'est le cas, les tissus maternels sont délicatement déchirés et les larves matures sont relâchées. Afin de récupérer plus de larves, l'éponge est placée au repos à une température de 14 °C et sans lumière quelques minutes. Par la suite, elle subit un choc lumineux afin de provoquer la libération des larves. Les larves nageuses sont photosensibles et attirées par la lumière. L'éponge mère est ensuite conservée dans un aquarium sans lumière et le lendemain, des larves peuvent être de nouveau récoltées après un autre choc lumineux. Les larves ont été par la suite soit fixées dans du PAF soit maintenues en aquarium afin de réaliser des expériences de métamorphose.

Les expériences de métamorphose chez *Oscarella lobularis* ont été réalisées durant les périodes de reproduction de 2007 et 2008. Elles se sont avérées laborieuses et malheureusement peu fructueuses. En effet, l'étape critique de la fixation de la larve sur un substrat fut problématique. Divers substrats ont été testés durant la période de reproduction de 2007: petite plaques de céramique, lamelles de verres, agarose à divers concentrations ... Les larves sont arrivées à se fixer sur de l'agarose mais le développement s'est arrêté au stade rhagon (Figure 2C). Au bout de quelques jours, elles se sont détachées et sont mortes. Aucune métamorphose complète n'a été obtenue. L'été suivant, nous avons essayé d'induire artificiellement la métamorphose par l'ajout de KCl. L'effet de ce produit chimique sur l'induction de la métamorphose chez les éponges avait été précédemment démontré (Woollacott et Hadfield, 1996). Une vingtaine de larves (par concentration) ont été récoltées et mises en contact avec des solutions de KCl de différentes concentrations (0 mM, 20 mM, 30 mM et 40 mM) pendant 2 minutes à l'aide d'un panier en téflon pour faciliter les

changements de solutions. Les larves ont été ensuite rincées dans un bain d'eau de mer filtrée puis transvasées dans une boîte de Pétri propre contenant divers supports potentiels. Ont été testés : les coquilles d'œufs, le corail rouge, un brin d'herbe, du papier filtre et un substrat naturel (fragments de roche). Quelques larves ont semblé se fixer sur le papier filtre, mais ne se sont pas développées par la suite. Aucun effet du KCl n'a été observé et aucune métamorphose complète n'a été induite. Les difficultés d'obtention de larves et d'induction de leur métamorphose sont des problèmes limitant le développement du modèle *Oscarella lobularis* qu'il sera indispensable de résoudre.

	Espèces
Oscarella	lobularis (Schmidt, 1862)
Oscarella	tuberculata (Schmidt, 1868)
Oscarella	carmela Muricy & Pearse, 2004
Oscarella	malakhovi Ereskovsky, 2006
Oscarella	viridis Muricy, Boury-Esnault, Bézac & Vacelet, 1996
Oscarella	microlobata Muricy, Boury-Esnault, Bézac & Vacelet, 1996
Oscarella	kamchatkensis Ereskovsky, 2009
Oscarella	« rubra »
Oscarella	nov. sp.
Oscarella	imperialis Muricy, Boury-Esnault, Bézac & Vacelet, 1996
Oscarella	nigraviolacea Bergquist & Kelly, 2004
Oscarella	stillans Bergquist & Kelly, 2004
Oscarella	nov. sp.1
Oscarella	nov sp.2
Oscarella	nov sp.3

Figure 22 : Les espèces d'*Oscarella* incluses dans l'étude de phylogénie moléculaire de la famille Oscarellidae actuellement en cours.

# **D]** Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, j'ai souhaité rassembler la majorité des connaissances acquises à l'heure actuelle sur les homoscléromorphes et sur notre modèle *Oscarella lobularis*, dont les études ont grandement été réalisées au sein de notre équipe avec l'aide de collaborateurs.

Le travail de phylogénie moléculaire sur six genres d'homoscléromorphes a permis de restaurer l'ancienne classification en deux familles Oscarellidae et Plakinidae. Il est suivi en ce moment même par un travail de phylogénie moléculaire interne au genre *Oscarella*. L'un des points importants à éclaircir est la position de *Pseudocorticium jarrei* (seule espèce du genre *Pseudocorticium*) au sein des *Oscarella* et ainsi la validité du genre *Pseudocorticium* (Figure 22).

L'acquisition récente de données transcriptomiques en grandes quantité (run 454 de séquençage) va dans un proche avenir permettre de mieux définir *Oscarella lobularis* d'un point de vue moléculaire. L'analyse approfondie du contenu de ces données de séquençage est à l'heure actuelle en cours grâce à une collaboration avec l'équipe du Professeur Pierre Pontarotti<sup>6</sup>. La représentativité des diverses familles/classes de gènes, membres des voies de signalisation bien que non exhaustive sera évaluée et comparée avec les données issues du génome complet d'*Amphimedon*, des autres métazoaires basaux et également du choanoflagellé *Monosiga brevicollis*. La disponibilité de nombreux gènes facilitera également les prochaines études (affranchissement de l'étape problématique de recherche de gènes par PCR avec amorces dégénérées).

Cependant, les caractéristiques inhérentes au modèle: difficultés de maintien en aquariums, d'induction de la métamorphose, sa reproduction uniquement en été et le nombre de larves peu élevé sont des limites pour cette espèce. Ainsi, le cycle complet en aquarium est loin d'être maîtrisé et ce n'est malheureusement le cas pour aucun modèle spongiaire à l'heure actuelle. Les expériences d'inhibitions fonctionnelles par injections de morpholinos ou RNAi dans les embryons semblent irréalisables chez *Oscarella lobularis*, les embryons étant inclus dans les tissus maternels jusqu'à l'émission de la larve mature. Cependant, on pourrait peut-être envisager d'administrer de façon passive les RNAi en les diluant dans l'eau de mer et en laissant des éponges en reproduction la filtrer. Les marquages *in situ* pourront sûrement être réalisés sur les larves à très court terme. Une alternative tout aussi intéressante à ces études

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Evolutionary Biology and Modeling, Université de Provence, Marseille.



Figure 23 : (A) Expérience de régénération d'*Oscarella lobularis* (Alexander Ereskovsky, MEB). (B) Stade initial de bourgeonnement chez *Oscarella lobularis*, B= bourgeon (Ereskovsky, 2006). (C) Agrégat de 13 jours chez *Oscarella lobularis* présentant des structures en forme de cavités entourées de cellules pigmentées (Thomas Bagarre). (D) Coupe du même agrégat montrant des cavités clairement délimitées par des cellules évoquant une ébauche de canal ou de chambre (Thomas Bagarre).

limitées sur le développement propre des embryons d'*Oscarella lobularis* est la mise en place d'expériences lors des morphogenèses somatiques telles que la régénération, le bourgeonnement et la réagrégation cellulaire. La forte mobilité cellulaire des éponges et la présence de cellules totipotentes tout au long de la vie facilitent ces processus et permettent une forte plasticité phénotypique (Ereskovsky, 2006).

La capacité à réparer des parties manquantes d'un individu est une caractéristique générale de tous les organismes, cependant, ce potentiel est néanmoins d'intensité variable selon les taxons considérés. Le potentiel de régénération des métazoaires basaux (cnidaires (Galliot et Schmid, 2002 ; Holstein *et al.*, 2003), cténophores (Henry et Martindale, 2000), *Trichoplax* (Miller et Ball, 2005) et éponges (Ereskovsky, 2006 ; Leys *et al.*, 2007) est remarquablement élevé et permet parfois même la reconstruction d'un organisme complet à partir d'un petit fragment. L'étude du processus de régénération chez *Oscarella lobularis* est actuellement en cours dans notre équipe (Alexander Ereskovsky, Pascal Lapébie, Figure 23A).

La reproduction chez les éponges peut être de deux types : sexuée mais également asexuée. Cette dernière existe dans toutes les lignées d'éponges et inclut les processus de fragmentation, de bourgeonnement et de gemmulation (Custodio *et al.*, 1998 ; Le Pennec *et al.*, 2003). Le bourgeonnement a été bien caractérisé chez notre modèle (Ereskovsky, 2006). On trouve parfois des bourgeons sur des individus prélevés *in situ* mais le bourgeonnement est également facilement inductible chez les éponges adultes lorsque l'on ne change pas leur eau de mer (Figure 23B).

Les éponges présentent également la capacité de réassocier leurs cellules artificiellement dissociées. Dans certains cas, à l'issu de ce processus des cellules différenciées et organisées voire des éponges fonctionnelles ont été obtenues (Simpson, 1984). Ce type d'expérience a été initié chez *Oscarella lobularis* (Stage de Thomas Bagarre, BTS Biotechnologies) et les résultats obtenus suivant divers protocoles expérimentaux sont encourageants mais nécessitent d'être affinés (Figure 23C et D).

La maîtrise de ces expériences permettrait d'étudier les processus morphogénétiques tout au long de l'année. Cependant, ces processus de morphogenèses somatiques, bien que proches de ceux observables chez l'embryons ne sont pas identiques. Une fois de plus, une stratégie de multiplication des modèles d'éponges est indispensable afin de compenser les limites inhérentes à chaque espèce.

# CHAPITRE III

L'origine du système neuro-sensoriel des métazoaires



Figure 24 (A) : Fermeture d'une feuille de dionée après stimulation expérimentale de ses poils sensitifs. (B) Le pincement de la feuille de sensitive a provoqué une réaction qui se traduit par le repliement progressif de tous les folioles d'un pétiole secondaire. Crédit photo : <u>http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/mouvements/nasties-thigmo.htm#l</u>

# A] Le système neuro-sensoriel

## A.1 : Définition du système nerveux / neuro-sensoriel

Tous les organismes vivants, qu'ils soient unicellulaires ou multicellulaires, ont la capacité de répondre à des stimulus perçus dans l'environnement (Brusca et Brusca, 2003).

Chez les unicellulaires, les étapes de réception du stimulus et de réponse associée ont lieu dans la même cellule. Chez les organismes pluricellulaires, répondre à des stimulus nécessite la conduction de l'information d'une cellule à une autre, et pour cela, différentes stratégies ont été mises en place chez les plantes et les animaux.

Chez les plantes, il existe des phénomènes de réponse rapide (de l'ordre du cm par seconde) à un stimulus environnemental via l'utilisation de signaux électriques ou chimiques. C'est le cas par exemple des processus de thigmonastie : mouvements actifs et réversibles dus à des variations différentielles de turgescence. Un phénomène électrique comparable à un potentiel d'action est généré au niveau du lieu de perception du stimulus et se propage jusqu'au lieu de la réponse. Ce phénomène a été identifié chez une plante carnivore : la dionée gobe-mouche (Dionea muscipula ellis) et chez la sensitive (Mimosa pudica L.) (Figure 24 A et B) (Brenner et al., 2006). Chez les animaux, le système nerveux coordonne les fonctions d'un individu et contribue à ses relations avec le milieu extérieur (environnement) ou à la communication interne (venant de différentes parties de l'organisme) via des mécanismes chimiques ou électriques de conduction de l'information. L'unité considérée comme fondamentale du système nerveux est une cellule excitable hautement spécialisée, le neurone. Les neurones forment des réseaux plus ou moins complexes de communication; ils sont capables de produire et de transmettre à d'autres cellules un influx nerveux très rapidement et sur de longues distances grâce à des structures spécialisées : les synapses. Il est actuellement communément admis que la présence de neurones est une condition sine qua none pour parler de système nerveux. Ainsi, le système nerveux est considéré comme une synapomorphie des eumétazoaires, les neurones étant absents chez les éponges et les placozoaires.

Le terme de système neuro-sensoriel fait référence à un système coordonné et intégré de cellules, tissus et organes dont les deux fonctions principales sont la réception d'informations (fonction sensorielle) et la transmission d'informations (jusqu'aux fonctions effectrices).



Figure 25 (A) : Dessin de neurones de cnidaires, N : neurites, Cc : corps cellulaire (Bullock et Horridge, 1965).

(B) Les deux types de synapses identifiées chez les cnidaires. a : la synapse électrique. Au niveau des jonctions Gap se trouvent des canaux ioniques, qui constituent des pores de communication, mettant en continuité les cytoplasmes des deux cellules. Les ions passent dans les deux sens et le potentiel d'action se prolonge directement d'une cellule à l'autre permettant une conduction de l'information extrêmement rapide. b : la synapse chimique. L'arrivée d'un potentiel d'action entraine l'ouverture de canaux  $Ca^{2+}$  voltage dépendants et l'exocytose de vésicules remplies de neurotransmetteurs. Ces derniers diffusent dans la fente synaptique et se lient aux récepteurs post-synaptiques, transmettant ainsi le signal.

Crédits photos : http://cours-biologie.over-blog.com/article-36664193.html

## A.2 : Morpho-anatomie du système neuro-sensoriel des eumétazoaires

#### A.2.1 : Neurones et synapses

La cellule fondamentale du système nerveux des eumétazoaires est le neurone. Cependant, des différences de morphologie et de fonctionnement sont à noter entre les neurones de cnidaires et de cténophores et ceux de bilatériens.

Chez les non-bilatériens, le neurone est une cellule composée d'un corps cellulaire appelé péricaryon et de prolongements cytoplasmiques indifférenciés appelés neurites. Ces expansions favorisent le contact entre la cellule et le reste du réseau nerveux (Brusca et Brusca, 2003) (Figure 25A).

Les synapses assurent les connexions entre cellules nerveuses ou entre cellules nerveuses et cellules effectrices. Chez les cnidaires, elles peuvent être de deux types : électrique ou chimique. Les chimiques ont la particularité d'être bidirectionnelles (Anderson, 1985) (Figure 25B). Dans la synapse électrique, les membranes des deux neurones sont reliées par des jonctions communicantes ou jonctions GAP. Les ions se transmettent d'une cellule à une autre permettant ainsi un délai de transmission quasi-inexistant et une conduction dans les trois directions de l'espace avec absence de période réfractaire.

Alors que l'influx nerveux est transmis le long d'un neurone sous la forme d'une séquence de potentiels d'action (PA), au niveau d'une synapse chimique l'information change de nature. En effet, les trains d'onde de dépolarisation de la membrane (supportés par des courants électrochimiques), sont convertis en codage chimique par concentration de vésicules remplies de neurotransmetteurs diffusibles dans la fente synaptique. Le changement de polarité de membrane provoqué par l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau de la synapse déclenche l'ouverture de canaux calcium membranaires voltage-dépendants. L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire qui en résulte provoque la fusion des membranes vésiculaires avec la membrane plasmique et la libération des neuromédiateurs. La synapse chimique transmetteur qui est émis par le neurone afférent, diffuse dans la fente synaptique et se lie aux récepteurs post-synaptiques de la cellule réceptrice. Ces synapses sont unidirectionnelles mais leur capacité à évaluer l'intensité des signaux afférents et la variété des réponses qu'elles peuvent générer permettent des réponses plus fines, dépendantes du



http://www.dmacc.edu/instructors/rbwollaston/Chapter\_8\_Nervous\_System.htm http://onderwijs1.amc.nl/medfysica/doc/Bioelectricity%20Chemical%20synapse.htm nombre de récepteurs (Ryan et Grant, 2009). Ce sont les seules ayant une capacité inhibitrice, elles sont majoritaires chez les cnidaires. Des études ultrastructurales, électrophysiologiques et biochimiques des synapses de cnidaires ont permis d'établir l'homologie avec les synapses de bilatériens (Anderson, 2004 ; Denker, 2008). Les cténophores, quant à eux, possèdent des neurones non polarisés et des synapses chimiques (Hernandez-Nicaise, 1973a, 1973b, 1973c).

Chez les bilatériens, contrairement aux cnidaires et cténophores, les neurones sont fortement polarisés et les prolongements cytoplasmiques très différenciés sont appelées dendrites (signal afférent) et axones (signal efférent). La morphologie, la localisation et le nombre de ces prolongements, ainsi que la forme du soma, varient et contribuent à définir différentes familles morphologiques de neurones (neurones unipolaires = un seul axone; neurones bipolaires ou multipolaires = un seul axone et plusieurs dendrites...). L'axone qui conduit l'influx nerveux ou potentiel d'action décrit un trajet plus ou moins long avant de se terminer en se ramifiant. Chaque ramification se termine par un renflement, le bouton synaptique contenant des microvésicules (complexe pré-synaptique). Les dendrites sont nombreuses, courtes et très ramifiées dès leur origine. Contrairement à l'axone, elles ne contiennent pas de microvésicules permettant la transmission de l'information à l'extérieur du neurone. La dendrite conduit l'influx nerveux, induit à son extrémité, jusqu'au péricaryon. Les bilatériens présentent également les deux types de synapses décrits précédemment, bien que la synapse de type électrique soit rencontrée majoritairement chez les bilatériens non vertébrés (Figure 26A). Les cellules gliales sont le deuxième type cellulaire majeur qui compose le système nerveux des bilatériens. Elles sont plus nombreuses que les neurones et remplissent diverses fonctions telles que guide de migration, développement neuronal, myélinisation, compartimentalisation, soutien, homéostasie ionique, régulation du pH, recyclage des neurotransmetteurs, défense immunitaire, plasticité synaptique ... Parmi les bilatériens, les vertébrés possèdent une variété de cellules gliales plus importante. Certains axones sont recouverts d'une gaine de myéline, (formée par un type de cellules gliales, les oligodendrocytes) permettant ainsi une plus grande vitesse de passage de l'information nerveuse (Figure 26B).



Figure 27 (A): Neurones bipolaires (a) ou multipolaires (b) (également appelés cellules ganglionnaires) et neurones sensoriels (c) d'*Hydra vulgaris* (après macération) marqués au DAPI (bleu, pour visualiser le noyau) et avec un anticorps anti  $\alpha$ -tubuline (rouge) (Galliot *et al.*, 2009).

(B) Exemple de cellule sensorielle de bilatériens : la cellule ciliée de l'oreille interne et le détail de l'organelle mécano-sensorielle.

Crédit photo : http://www.curie.fr/recherche/themes/detail\_equipe.cfm/lang/\_fr/id\_equipe/323.htm
### A.2.2: Neurones, neurones sensoriels, cellules sensorielles et structures sensorielles

Dans un système sensoriel, un récepteur sensoriel est une structure capable d'être activée par un stimulus de l'environnement interne ou externe. En réponse à ce stimulus, le récepteur peut initier une transduction par potentiel électrochimique ou potentiel d'action sur la même cellule ou sur une cellule adjacente. Chez les cnidaires, les cellules nerveuses sont classées en deux catégories : les cellules ganglionnaires et les cellules sensorielles (ou neurones sensoriels) (Figure 27A). Les cellules ganglionnaires sont, en général, grandes et bipolaires ou multipolaires. Les cellules sensorielles sont souvent multipolaires, ciliées et capables d'émettre des potentiels d'actions (Galliot et al., 2009). Elles ne sont pas homologues aux cellules sensorielles de bilatériens. De ce fait, elles sont souvent nommées neurones sensoriels pour éviter les confusions. Il en existe de très nombreux types, possédant diverses propriétés et une variété de structures ciliaires (Denker, 2008). En plus des cellules ganglionnaires et sensorielles, il existe un 3<sup>e</sup> type cellulaire très abondant, les cnidocytes. Ce sont des cellules neurosensorielles particulières, qui lorsqu'elles perçoivent un stimulus, déchargent leur cnidocyste. Il existe également de nombreuses structures sensorielles tels que les statocystes (organe d'équilibration), les ocelles (photorécepteurs), et les rhopalies (organes sensoriels plus élaborés qui combinent des éléments photosensibles, d'équilibration et des chémorécepteurs). Ainsi, la séparation entre fonctions sensorielle et nerveuse n'est pas très nette chez les cnidaires, on parle plutôt de continuum et on pourrait tout aussi bien les englober dans une seule catégorie de cellules « neuro-sensorielles » (Manuel, 2007).

A l'inverse, c'est rarement le cas chez les bilatériens, où en général, des structures ou cellules spécialisées assurent la fonction de réception de l'information. Néanmoins, il existe également un autre type plus rare de neurones, des neurones spécialisés, ciliés, les neurones sensoriels ou cellules neurosensorielles, qui assurent la réception des informations et leur intégration. Contrairement aux neurones « classiques » du système nerveux, les neurones sensoriels sont activés par des stimulus physico-chimiques tels que la température, le son, la lumière etc … Au niveau moléculaire, les récepteurs sensoriels sont situés sur la membrane plasmique des neurones sensoriels responsables de la conversion du stimulus en impulsions électriques. Le type de récepteur (mécanorécepteur, olfactif …) employé dans un neurone sensoriel donné conditionne le type de stimulus auquel il est sensible. Il est cependant à noter que les neurones sensoriels sont assez rares chez les bilatériens. La différence entre cellules sensorielles et neurones sensoriels est que les premières ne génèrent pas de potentiel d'action.



Figure 28 : (A) Anatomies schématiques des protostomiens et des deutérostomiens présentant le système nerveux central respectivement en position ventrale et dorsale (Watanabe *et al.*, 2009). Noter le cas particulier de l'hémichordé *Saccoglossus kowaleskii* présentant des chordes nerveuses ventrale et dorsale (Schubert, 2004). (C-D) Système nerveux diffus. C : Immunomarquage anti-RF amide révélant le système nerveux diffus d'*Hydra oligactis*, échelle : 50  $\mu$ m (Denker, 2008). D : Dessin de la morphologie externe d'un cténophore montrant le réseau nerveux diffus sous-épithélial (Derelle, 2007).

Crédit photos : http://scienceblogs.com/pharyngula/2006/01/hemichordate\_evodevo.php

C'est le cas notamment des cellules ciliées de l'oreille ou des cellules bipolaires de la rétine (Figure 27B).

# *A.3* : *Répartition des cellules neuronales dans les plans d'organisation : systèmes nerveux centralisés ou diffus*

La très grande majorité des bilatériens présente une forte condensation du système nerveux formant ce qu'on appelle le système nerveux central (SNC). Ils sont également caractérisés par une céphalisation, c'est-à-dire une condensation du SNC et d'organes sensoriels dans la partie antérieure de l'animal conduisant à l'individualisation d'une tête. Cependant, la morphologie du SNC diffère fortement en fonction des taxons considérés, notamment entre deutérostomiens et protostomiens.

Ainsi, les chordés présentent une organisation du SNC, appelée tube neural situé dans la partie dorsale de l'organisme (épineuriens). La présence de ce tube neural est d'ailleurs une synapomorphie de ce clade (Figure 28A).

Les protostomiens (lophotrochozoaires et ecdysozoaires) ont un SNC organisé sous forme de chaîne nerveuse située en position ventrale (hyponeuriens) à l'exception des ganglions cérébraux en position dorsale (Figure 28A). La chaîne nerveuse ventrale est composée de deux ganglions nerveux par segments (pour les organismes métamérisés) ou par régions (pour les organismes non métamérisés), reliés entre eux par des faisceaux de fibres nerveuses.

Il est à noter que certains organismes font exception à cette règle. C'est le cas notamment du groupe des hémichordés (deutérostomiens) et en particulier *Saccoglossus kowaleskii*. Leur système nerveux est composé d'un réseau de nerfs basi-epithéliaux autour du corps formant deux faisceaux d'axones (un dorsal et un ventral) non condensés (Lowe *et al.*, 2003 ; Schubert, 2004) (Figure 28B et C). Les échinodermes, quant à eux, sont également des deutérostomiens possédant un système nerveux dit diffus (épithélioneuriens).

Les cnidaires et les cténophores ont un système nerveux non centralisé. Ce système dit diffus est un système de cellules nerveuses et de fibres connectées, réparties sur l'ensemble d'un animal, arrangées de façon à permettre une conduction diffuse de l'excitation nerveuse (Bullock et Horridge, 1965). La transmission des signaux sensoriels est réalisée par une



connexion directe entre des neurones sensoriels et des neurones effecteurs (Westfall *et al.*, 2002) (Figure 28D).

Chez les cténophores, on note la présence d'un réseau nerveux sous épidermique diffus polygonal, situé entre l'épithélium et la lame basale (Hernandez-Nicaise, 1973a) (Figure 28E). Les peignes (ensembles de très long cils alignés en huit rangées) sont ainsi en contact avec une zone riche en cellules nerveuses (Brusca et Brusca, 2003). Il existe deux autres réseaux nerveux (au niveau gastrovasculaire et intramésogléen) (Hernandez-Nicaise, 1973b, 1974).

Chez les cnidaires, les cellules nerveuses forment un réseau basiépithélial dont les cellules sensorielles émergent entre les cellules myoépithéliales vers l'extérieur (Denker, 2008).

Cependant, la simplicité du système nerveux des cnidaires et des cténophores ne serait peutêtre qu'apparente. En effet ce réseau nerveux est, chez certaines espèces, non homogène (Derelle, 2007 ; Denker, 2008). Ainsi, une condensation de ce système nerveux est parfois observée chez certaines espèces de cnidaires ou cténophores (Figure 29 ABC). Il a été montré chez ces derniers, et en particulier chez *Euplokamis dunlapae* (cydippidae), la présence d'axones géants reliés *via* des synapses à des neurites du plexus ectodermal, entre eux et également aux cellules des peignes (Mackie *et al.*, 1992). Ils semblent constituer un système autonome de conduction rapide du signal.

Chez les cnidaires, il existe également de nombreux exemples de condensation partielle du réseau nerveux : certaines espèces d'hydres présentent un anneau nerveux à la base de l'hypostome (Koizumi *et al.*, 1992) ou des tentacules (Miljkovic-Licina *et al.*, 2004), les méduses cubozoaires possèdent un anneau nerveux condensé à la base de leur ombrelle (Garm *et al.*, 2007) (Figure 29 DE), les méduses d'hydrozoaires ont, quant à elles, deux anneaux nerveux situés à la marge de l'ombrelle (Grimmelikhuijzen *et al.*, 1989). Il est également intéressant de noter la présence chez les siphonophores d'un syncytium neuronal (issu de la fusion de neurones) formant un axone géant (Brusca et Brusca, 2003).

Il existe donc des formes de condensation du système nerveux, y compris chez des taxons où il est habituellement décrit comme diffus, même si les structures condensées ne sont pas considérées comme homologues à celles du SNC des bilatériens.



# *A.4* : Conservation à l'échelle des eumétazoaires des gènes impliqués dans la mise en place du système nerveux

Au sein des bilatériens, l'accumulation de données moléculaires et génétiques a prouvé la très grande conservation des circuits génétiques impliqués dans de nombreux processus développementaux (De Robertis, 2008), et notamment lors de la formation du système nerveux (Denes et al., 2007 ; Telford, 2007). La neurogenèse nécessite l'activation de diverses voies de signalisation et facteurs de transcription. En effet, durant le développement, des facteurs diffusibles antagonistes des voies de signalisation BMP (Bone Morphogenetic Protein) (chordin/short gastrulation), Wnt et FGF (fibroblast growth factors) vont générer un gradient d'activation de facteurs de transcription (Zic, Sox, Churchill ...) à la surface de l'ectoderme. Une partie de cet ectoderme deviendra le neurectoderme qui, par la suite, donnera naissance aux cellules nerveuses. Ces facteurs de transcription vont également activer des gènes spécifiques, les gènes proneuraux (codant pour des facteurs de transcription à domaine bHLH (basic hélice-boucle-hélice) qui vont conférer la compétence neuronale aux cellules. Ces facteurs de transcription à bHLH vont activer des gènes neurogéniques (notamment le récepteur Notch et le ligand Delta de la voie Notch) qui vont eux-mêmes réguler les cellules exprimant les gènes proneuraux. Les cellules sélectionnées par cette régulation via le processus d'inhibition latérale de la voie Notch (voir chapitre V) vont par la suite exprimer des gènes impliqués dans la spécification neuronale (familles Nkx, Pax, Irx) (Guillemot, 2007; Denker, 2008) (Figure 30A).

Malgré de profondes divergences entre les système nerveux de bilatériens et de cnidaires (cf. paragraphe précédent), les premières études d'expression de gènes, dès 1998, ont permis d'émettre l'hypothèse d'une origine commune de la neurogenèse entre bilatériens et cnidaires (Galliot *et al.*, 2009). Cette hypothèse est à l'heure actuelle confortée par divers faits : la présence chez les cnidaires de gènes homologues à ceux impliqués dans la neurogenèse chez les bilatériens, des patrons d'expression de ces gènes compatibles avec une possible fonction dans la neurogenèse, des expériences de perte ou de gain de fonction de gènes affectant le processus de neurogenèse et des expériences de transgenèse entre cnidaires et bilatériens (Galliot *et al.*, 2009) (Figure 30B). Ainsi, une grande conservation des voies de signalisation et facteurs de transcription impliqués dans la mise en place du système nerveux a été trouvée entre cnidaires et bilatériens (Galliot *et al.*, 2009). Il a été démontré que quatre des sept voies de signalisation majeures sont impliquées dans la neurogenèse des cnidaires (Galliot *et al.*, 2009).

2009): les voies FGF (Rentzsch *et al.*, 2008), Wnt canonique (Denker *et al.*, 2008b), TGF $\beta$ /BMP (Rentzsch *et al.*, 2006), Notch (Kasbauer *et al.*, 2007 ; Khalturin *et al.*, 2007) et Hedgehog. Parmi la multitude de facteurs de transcriptions exprimés durant la neurogenèse des bilatériens, les gènes à homéoboîtes et les protéines bHLH apportent une contribution majeure (Guillemot, 2007). Chez les cnidaires des gènes appartenant aux classes ANTP (*Not, Msx, Gsx,*), Paired (*Pax, paired-like, Rx, repo, gsc, six*), bHLH (*Achaete-scute, atonal*), Sox, winged-helix (*FoxB*), MADS-box (*Mef2*), zinc fingers (*zic*), des récepteurs nucléaires (*COUP-TF, RXR*), Runx/CBP $\beta$  and bZIP (*CREB*) ont très vraisemblablement des fonctions neurogéniques chez les cnidaires. Bien que le recrutement indépendant de gènes orthologues pour assurer les mêmes fonctions ne puisse être exclu, ce scénario est peu parcimonieux. Il est donc fortement probable que l'ancêtre commun aux eumétazoaires possédait déjà ce répertoire génétique et qu'il ait été impliqué ancestralement dans la neurogenèse.

## B] Connaissances actuelles sur l'origine du système neurosensoriel : l'apport des éponges.

### B.1 : Présentation de l'article

Parmi les métazoaires, seuls les éponges et les placozoaires sont dépourvus de l'unité fondamentale du système nerveux, le neurone.

Malgré l'absence de neurone, les éponges ne sont pas des organismes passifs. En effet, de nombreuses larves d'éponge sont capables de répondre rapidement à des stimuli extérieurs variés tels que la lumière (*via* essentiellement l'utilisation de cellules pigmentées), le courant, la pression (Maldonado, 2006). Les éponges adultes présentent également des réactions à divers stimulus et parfois des contractions rythmiques intrinsèques (Nickel, 2004, 2006). La mise en évidence de ces capacités de perceptions/réactions chez les éponges implique donc la présence de mécanismes de conduction de l'information. Trois hypothèses concernant l'origine du système nerveux peuvent être proposées en fonction des relations phylogénétiques à la base de l'arbre des métazoaires. Le système nerveux serait soit apparu chez l'ancêtre commun des eumétazoaires, soit apparu chez l'ancêtre commun des métazoaires et perdu dans les lignées d'éponges et des placozoaires, ou soit apparu deux ou trois fois au cours de l'évolution, chez les cténophores et les eumétazoaires. Le contexte phylogénétique toujours irrésolu de la base de l'arbre ne permet pas à l'heure actuelle de trancher entre ces diverses hypothèses (Dunn *et al.*, 2008 ; Philippe *et al.*, 2009).

Cette étude avait pour but de contribuer à la compréhension de ce mécanisme de conduction en intégrant toutes les données notamment les plus récentes de type physiologique, cytologique, biochimique et moléculaire obtenues chez les éponges. Cette revue avait également pour objectif de susciter plus d'intérêts de la part de la communauté scientifique envers les éponges qui sont des organismes prometteurs pour comprendre l'origine et l'évolution du système neuro-sensoriel des animaux.

Ce travail dont je suis co-auteur a fait l'objet d'un article de revue paru dans Integrative Zoology en 2009.

*B.2*: *Article 4*: Origin of the neuro-sensory system : new and expected insights from sponges

### REVIEW

# Origin of the neuro-sensory system: new and expected insights from sponges

# EMMANUELLE RENARD,<sup>1</sup> Jean VACELET,<sup>1</sup> Eve GAZAVE,<sup>1</sup> Pascal LAPÉBIE,<sup>1</sup> Carole BORCHIELLINI<sup>1</sup> and Alexander V. ERESKOVSKY<sup>1,2</sup>

Centre d'océanologie de Marseille, CNRS – Aix-Marseille Université, Marseille, France and <sup>2</sup>Department of Embryology, Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

### Abstract

The capacity of all cells to respond to stimuli implies the conduction of information at least over short distances. In multicellular organisms, more complex systems of integration and coordination of activities are necessary. In most animals, the processing of information is performed by a nervous system. Among the most basal taxa, sponges are nerveless so that it is traditionally assumed that the integrated neuro-sensory system originated only once in Eumetazoa, a hypothesis not in agreement with some recent phylogenomic studies. The aim of this review is to show that recent data on sponges might provide clues for understanding the origin of this complex system. First, sponges are able to react to external stimuli, and some of them display spontaneous movement activities. These coordinated behaviors involve nervous system-like mechanisms, such as action potentials and/or neurotransmitters. Second, genomic analyses show that sponges possess genes orthologous to those involved in the patterning or functioning of the neuro-sensory system in Eumetazoa. Finally, some of these genes are expressed in specific cells (flask cells, choanocytes). Together with ultrastructural data, this gives rise to challenging hypotheses concerning cell types that might play neuro-sensory-like roles in sponges.

Key words: animal evolution; choanocyte; flask cells; nervous system; Porifera; signal transduction.

### INTRODUCTION

All living organisms are able to respond to some stimuli. This implies the existence of electrical or chemical mechanisms for conducting information at least over short distances at intracellular level.

Together with the acquisition of multicellularity, signal

Email: emmanuelle.renard@univmed.fr

transduction over longer distances as well as intercellular communication mechanisms are required to ensure efficient coordination, movement or behavior of the whole organism. This has been well documented for both plants and animals where both chemical pathways and electrical signal transmissions are involved (Brenner *et al.* 2006).

In most metazoans (Cnidaria, Ctenophora and Bilateria forming Eumetazoa), integration and coordination is largely achieved by the nervous system, the fundamental unit of which is classically considered to be a specialized high velocity impulse conducting cell: the neuron. The term "neuro-sensory system" is also currently used to refer to the ensemble of tissues and organs involved in both perception (sense organs) and signal conduction to effectors. The remaining animal taxa, Porifera (sponges) and

*Correspondence*: Emmanuelle Renard, Centre d'Océanologie de Marseille, Station marine d'Endoume, Aix-Marseille Université – CNRS UMR 6540-DIMAR, rue de la Batterie des Lions, Marseille 13007, France.

Placozoa, are devoid of neurons (Pavans de Cecatty 1989; Schierwater 2005). Their relatively simple body plans (e.g. absence of organs, basement membrane and limited number of cell types) have suggested to zoologists that these two phyla may either be regarded as colonial protozoa or represent the first multicellular animals (Haeckel 1874, and reviewed in Schierwater 2005). According to the traditional gradualist view of evolution, it has generally been considered that the integrated neuro-sensory system was absent in the last common ancestor (LCA) of metazoans (later referred to as Urmetazoa, Müller *et al.* 2001) and would have appeared once in the LCA of so-called "true" Metazoa (referred to as Eumetazoa).

Nowadays, although both sponges and Placozoa are considered as indisputable metazoans (Srivastava 2008; Philippe *et al.* 2009), the relationships between early branching taxa is still uncertain.

Most molecular data, including very recent phylogenomic analyses, are consistent with a basal position of sponges (Srivastava et al. 2008; Philippe et al. 2009), while a few studies have proposed instead Placozoa (Schierwater 2005; Dellaporta et al. 2006; Schierwater et al. 2009) or, more surprisingly, Ctenophora (De Salle & Schierwater 2008; Dunn et al. 2008) (Fig. 1). We may note that the position of the two latter taxa has always been very doubtful because of suspected long branch attraction (LBA) biases. Traditionally, sponges are divided into three lineages (Hooper & Van Soest 2002): Demospongiae, Hexactinellida and Calcispongia. More recently, Homoscleromorpha have been proposed as a fourth sponge lineage phylogenetically distinct from the Demospongiae among which they were formerly classified (Borchiellini et al. 2004; Nichols 2005; Sperling et al. 2007; Dohrmann et al. 2008; Nielsen 2008; Ereskovsky et al. 2009; Philippe et al. 2009). The question of whether or not these four lineages form a monophyletic group is still under debate (Fig. 1) (Borchiellini et al. 2001, 2004; Medina et al. 2001; Dohrmann et al. 2008; Dunn et al. 2008; Nielsen 2008; Wang & Lavrov 2008; Philippe et al. 2009). These controversial relationships have led to several possible hypotheses concerning the origin and evolution of main body plan features, not always in agreement with the traditional scenario of gradual complexification. As far as the nervous system is concerned, three hypotheses are possible (Fig. 1):

1. If sponges form a paraphyletic group (whatever the position of the Placozoa), then the Urmetazoa might rather have been a nerveless animal and the nervous system would have appeared once in the LCA of Eumetazoa.

2. If sponges form a monophyletic group, contending

with Placozoa to be a sister group of Eumetazoa, the most parsimonious scenario is the same.

3. In contrast, if Ctenophora are the earlier emerging animal group, then either the ancestral Metazoa was complex with a neuro-sensory system and a secondary simplification occurred in Porifera and Placozoa, as obviously occurred several times during animal evolution, or complexity (including neuro-sensory structures) appeared independently in Ctenophora and Cnidaria+Bilateria (Dunn *et al.* 2008; Jager *et al.* 2008; Pang & Martindale 2008).

Therefore, to be resolved, the question of the origin of the neuro-sensory system requires not only complementary data concerning non-bilaterian animals, but also a more solid phylogenetic background as a basis for interpretation.

The aim of this review is to contribute to this general debate by surveying major recent physiological, cytological, biochemical and molecular data concerning receptive-effective functions in sponges. As a result of the over-simplistic traditional view, these animals have long been neglected. Recent data suggest new and challenging hypotheses and clues that are discussed in the present paper. We hope that this survey will help and encourage further studies.

## PERCEPTION/RESPONSE ABILITY AND BEHAVIOR: SPONGES ARE NOT SUCH PASSIVE ANIMALS!

### Larvae

Sponge larvae are mobile and exhibit, like most eumetazoans, rapid responses to external stimuli (for review: Maldonado 2006): geotaxis (Warburton 1966), phototaxis (Warburton 1966; Bergquist & Sinclair 1968; Wapstra & Van Soest 1987; Woollacott 1993; Maldonado & Young 1999; Leys & Degnan 2001; Maldonado et al. 2003; Elliott et al. 2004; Uriz et al. 2008) and rheotaxis (Maldonado & Young 1999) have all been documented in sponge larvae. Phototaxis has been the most extensively studied so far, especially in demosponge parenchymella larvae, most complete studies being performed on Amphimedon queenslandica Hooper & van Soest, 2006 (formerly Reniera sp., Leys & Degnan 2001; Leys et al. 2002). This study evidenced the role of pigmented ciliated cells, forming a ring at the posterior pole of the larvae, in response to light: these cells are assumed to play both receptor and effector roles, which would explain the rapidity of behavior change. Similar processes might be involved in light E. Renard et al.

perception for other sponge larvae because posterior pigmented ciliated cells are found in various groups of demosponges (Wapstra & Van Soest 1987; Maldonado *et al*. 2003; Ereskovsky & Tokina 2004; Maldonado 2006). The organization of these ciliated pigmented cells is reminiscent of simple pigmentary cups of eumetazoans

A.

(Maldonado *et al.* 2003). However, other sponge larvae exhibit light perception capability, although they do not possess pigmented cells (Elliott *et al.* 2004; Gonobobleva & Ereskovsky 2004).

Therefore, in most cases, although larvae have been proved to be capable of perception of various stimuli, the

Figure 1 Hypothesized phylogenetic relationships between the first emerging lineages of Metazoa and their implications for scenarios concerning the origin R of the neuro-sensory system (according to the parsimony principle): (A) Sponges forming a paraphyletic group at the base of the metazoan tree (Borchiellini et al. 2004; Sperling et al. 2007; Nielsen et al. 2008), the Urmetazoa is assumed to be devoid of nervous system (whatever the position of Placozoa). (B) Porifera forming the first emerging monophyletic group of Metazoa, Placozoa being sister-group of Eumetazoa (Philippe et al. 2009): the Urmetazoa is also thought to be devoid of a neuro-sensory system; C. (C) Ctenophora being the first emerging metazoan lineage (Dunn et al. 2008): either the Urmetazoa may have been complex with simplification in sponges and Placozoa (position not tested in this study) or the complexity of Ctenophora may represent a convergence with Cnidarians and Bilaterians. Apparition events are represented by colored lines, loss events by colored crosses (red, blue or green on C represent alternative scenarios).



receptor cells or the structures involved remain generally unknown.

### Adults

Despite their sessility, sponge adults also display different behavior patterns and types of reaction involving cell-cell communication and coordination. Since Aristotle (384-322 BC), it has been observed that sponge adults are capable of reacting. Responses to various stimuli were observed: mechanical (e.g. injury), electrical and chemical stimuli, changes of light, temperature, oxygen, salt concentration, presence of sediment (for review: Jones 1962; Leys & Meech 2006; Elliott & Leys 2007). Responses might affect the aquiferous system (opening/closure of oscula (exhalant pores) and ostia (inhalant pores), current velocity, flagellar activity of choanocytes), as well as more or less localized tissue contractions (Simpson 1984; Leys & Meech 2006; Pfannkuchen et al. 2008). Whereas specific sensory cells have not yet been clearly identified, the effector cells involved thus seem to be various: pinacocytes (Elliott & Leys 2007), contractile cells called actinocytes or myocytes (Bagby 1966; Elliott & Leys 2007), spherulous cells (Bonasoro et al. 2001), as well as choanocytes, even though not directly demonstrated (De Vos & Van de Vyver 1981; Leys & Meech 2006).

In addition to larvae and adult response capability to environmental stimuli, in various species, adults display spontaneous movement (Merejkowsky 1878; review in Jones 1962). Intrinsic rhythmic contractions have been well documented in Tethya (Demospongiae), resulting in contraction of the body volume up to 70% within 20 min in Tethya wilhelma Sarà et al., 2001 (Lieberkühn 1859; Schmidt 1866; Reiswig 1971; Sarà & Manara 1991; Nickel 2001, 2004, 2006; Nickel & Brummer 2003). Ephydatia muelleri Lieberkühn, 1855 (Demospongiae), even if it exhibits more discrete activity, has also been studied because its partial transparency makes observation at the cellular level easier (De Vos & Van de Vyver 1981; Weissenfels 1983, 1990; Simpson 1984; Elliott & Leys 2007). These rhythmic contractions of the body are assumed to enable more efficient renewal of water in the aquiferous system, which might be advantageous for species living in low current waters (Sarà 1990) or might limit obstruction of canals in areas under strong sedimentation (Elliott & Leys 2007; Leys & Tompkins 2005; Leys & Meech 2006; Simpson 1984). Pinacocytes and/or actinocytes might be involved by means of an actin-myosin mechanism (Nickel 2001; Elliott & Leys 2007). The rhythm of contractions can be modified by external stimuli, such as mechanical attacks (Nickel 2004; Elliott & Leys 2007) or chemicals (Ellwanger & Nickel 2006). These experiments provide

evidence that, nonetheless, some sponges are capable of coordinated movement, but also that this coordination constitutes an integrative response to environmental factors.

Even more unexpectedly for sessile animals, a few species are capable of crawling along a substratum (Bond & Harris 1988; Pansini & Pronzato 1990; Nickel 2006), albeit rather slowly: 1–4 mm per day for *Chondrilla nucula* Schmidt, 1862 (Bond & Harris 1988); and 4 mm per day for *T. wilhelma* (Nickel 2006). Experiments show that locomotion is modulated by environmental factors such as the nature of the substrata or the light intensity (Pronzato 2004; Nickel 2006) and that *T. wilhelma* is capable of changing direction almost instantaneously (Nickel 2006). Once again, this coordinated behavior, even if exceptional in sponges, implies efficient integrated perception–conduction mechanisms.

### CONDUCTION MECHANISMS IN THESE ANEURAL ANIMALS

The question of how sponges perform conduction and coordination was a major subject of debate among the spongiologist community for about 50 years (Parker 1910; Pantin 1952; Jones 1962; Lentz 1966; Pavans de Ceccatty 1974, 1979; Mackie 1979, 1990). The conclusion was that sponges do not possess a nervous system, because they lack neuronal cells (Pavans de Ceccatty 1989). In the absence of neurons, various hypotheses were proposed to try to explain the experimental observations (signal propagation from a few mm to 0.3 cm s<sup>-1</sup> observed in sponges versus several hundred cm s-1 often observed in neuronal conduction ; Leys & Mackie 1997; Leys et al. 1999; Elliott & Leys 2007): (i) cellular conduction: even if the velocity of contraction propagation observed is generally much slower than typical neuronal conduction, other cell types or particular cell-cell communication structures might be involved; (ii) chemical diffusion was envisaged, but the velocity and the unlocalized character of responses observed in some species seemed not to be consistent with diffusion mechanisms only, thus leading to the hypothesis of (iii) electrical conduction, where the velocity of conduction in hexactinellids was thought to be compatible with electrical mechanisms (Lawn et al. 1981; Simpson 1984) even if action potentials were not monitored in sponges until 1997 (Leys & Mackie 1997; Leys et al. 1999).

# Cellular conduction hypothesis: presence of specific cells or junctions?

Pavans de Ceccatty (1966, 1974) suggested that neu-

E. Renard et al.



**Figure 2** Specialized cell junctions in sponge larvae (A–D) and adults (E, F). (A) Parenhymella of *Ircinia oros* (Demospongiae, Dictyoceratida); (B) Dispherula of *Halisarca dujardini* (Demospongiae, Halisarcida); (C) Cinctoblastula of *Corticium candelabrum* (Homoscleromorpha); (D) Parenchymella of *Pleraplysilla spinifera* (Demospongiae, Dictyoceratida) with the desmosom-like cell junctions (insets). (E) Septate junctions (arrows) between sclerocytes of *Sycon ciliatum* (Calcispongia, Calcaronea); inset, septate junction (from: Ledger 1975). (F) Two mesohyl choanoblasts of *Farrea occa* (Hexactinellida) are plug-connected (arrow) (TEM). *Mt*, mitochondria; *Gb*, Golgi bodies; inset, plug junction (from: Reiswig & Mehl 1991).

Abbreviations: AP, anterior pole, PP, posterior pole. Scale bar, A, 100  $\mu$ m; Inset, 0.2  $\mu$ m; B, 50  $\mu$ m; Inset, 25 nm; C, 50  $\mu$ m; Inset, 0.2  $\mu$ m; D, 50  $\mu$ m; Inset, 0.2  $\mu$ m; E, 0.5  $\mu$ m; Inset, 0.1  $\mu$ m; F, 1  $\mu$ m; Inset, 0.2  $\mu$ m.

roid (bipolar) cells in the mesohyl of *Tethya* possessing vesicles, microfilaments and microtubules were neuroid cells. This hypothesis was controversial partly due to both lack of functional evidence and similarities with another cell type, the myocytes (Simpson 1984).

The most rapid responses were observed in hexactinellid species (0.2-0.3 cm s-1, Lawn et al. 1981). The syncytial nature of the tissues was, at first, thought to explain this velocity. In the other groups of sponges that have a cellular organization pattern, this explanation cannot be accepted. Moreover, no gap junctions facilitating cell-cell communications as in eumetazoans could so far be identified in cellular sponges (Green & Bergquist 1979; Garrone et al. 1980; Lethias et al. 1983). However, specialized cellular junctions, such as zonula adhaerens (Boury-Esnault et al. 2003; Ereskovsky & Tokina 2004, 2007; Gonobobleva & Ereskovsky 2004; Ereskovsky & Willenz 2008), septate junctions (Ledger 1975; Green & Bergquist 1979) and plug-junctions (Mackie & Singla 1983) do occur in sponges (Fig. 2), even if they are generally underestimated. The cell cohesion is strengthened in homoscleromorph sponges by the presence of a zonula adhaerens and a basement membrane containing type IV collagen and laminin (Boute et al. 1996; Boury-Esnault et al. 2003; Aouacheria et al. 2006), so that some authors propose considering this taxon with true epithelia, as "epitheliosponges" (Ereskovsky & Tokina 2007). No homoscleromorph species model has been studied so far in stimuli response experiments, but this tight cohesion of cells might favor the sponge's coordinated responsiveness.

In addition to these general considerations on adult sponge histology (syncytia of Hexactinellida, epithelia of Homoscleromorpha and peculiar junctions in Demospongiae and Calcispongia), some authors have reported other peculiar cohesive structures assumed to play a role in cell–cell communication and coordination: in demosponge parenchymellae, Maldonado *et al.* (2003) report cytoplasmic bridges between posterior ciliated cells thought to enable intercellular communication and thus coordinate the cell activity of these putative photoreceptor–effector cells.

Studies at the molecular level also provide evidence that sponges share with other animals the main ingredients for intercellular communication: (i) major extracellular matrix molecules such as collagens (Aouacheria *et al.* 2006; Exposito & Garrone 1990), laminin (Nichols *et al.* 2006), fibronectin domain (Labat-Robert *et al.* 1981); and (ii) and other molecules implicated in cell adhesion (Nichols *et al.* 2006).

# Chemical signaling hypothesis: implication of calcium and neurotransmitters

Quite early, studies provided evidence of sponge reactivity to chemicals known to influence the nervous system activity of eumetazoans. For example, Emson (1966) showed in Cliona celata Grant, 1826 the effect of various chemicals on the water circulation. Acetvlcholine, histamine and gamma-aminobutyric acid (GABA) modify the filtering activity. The presence of acetylcholine in sponges was first demonstrated by Mitzopolitanskaya (1941). Not only were other neurotransmitters subsequently discovered (epinephrine, norenephrine, epineurin, norepineurin, 5-oxytriptamin and serotonin), but also enzymes necessary for their synthesis, such as monoaminoxydase and cholinesterase (Mitzopolitanskaya 1941; Lentz 1966; Thiney 1972; Guerriero et al. 1993; Schäcke et al. 1994; Weyrer et al. 1999; Müller et al. 2004); as well as receptors: in Geodia cydonium Jameson, 1811 a metabotropic glutamate (mGlu) receptor-like protein is present and able to react to glutamate exposure by increasing the intracellular calcium concentration (Perović et al. 1999). Various neuroactive compounds also alter the rhythm of contraction in T. wilhelma (Ellwanger & Nickel 2006; Ellwanger et al. 2007), confirming the probable presence of numerous receptor types in sponges. Ramoino et al. (2007) performed western blotting staining of GABA, glutamate decarboxylase (GAD), vesicular GABA transporter (vGAT) and metabotropic GABA<sub>B</sub> receptors in Chondrilla nucula. Pinacocytes, choanocytes and scattered archeocytes show clear GABA immunoreactivity. Therefore, it is obvious that, like other animals, sponges use a complex neuromediator signaling system for cell communication and coordination.

Another classical mechanism implicated in cell reactivity to stimuli is the regulation of intracellular calcium concentration ([Ca2+],). The activation of the mGlu receptor of G. cydonium (Perović et al. 1999) and activation of the integrin receptor in Suberites domuncula Olivi, 1792 (Wimmer et al. 1999) were shown to result in an increase of  $[Ca^{2+}]$ . In the second case, the  $[Ca^{2+}]$  was shown to be regulated by a calmodulin. Temperature stress also induces an increase in [Ca2+], thought to be mediated by a conserved abscisic acid/cyclic ADP-ribose (ABA/cADPR) signaling pathway (Zocchie et al. 2001). While studying photoresponses in the larva of Amphimedon queenslandica, Leys and Degnan (2001) observed that an increased external potassium concentration caused reversible arrest of the beating of the long cilia. They hypothesized the intervention of depolarization of the membrane potential resulting in possible influx of calcium in the cilium, as reported in other Eukaryotes.

Taken together, these results show that sponges possess a complex chemical signaling system involving the intervention of several neuromediators acting in the eumetazoan nervous system, as well as a pivotal role for Ca<sup>2+</sup>, implicating conserved pathways such as cADPR and cAMP (Zocchie *et al.* 2001; Ellwanger & Nickel 2006).

# Electrical signaling: action potential in Hexactinellida

In a Hexactinellida, Rhabdocalyptus dawsoni Lambe, 1892, as in other studied sponges (Pavans de Ceccatty et al. 1960; Simpson 1984), water flow has been shown to be stopped rapidly (within 20 s) by mechanical or electrical stimuli (Lawn et al. 1981; Mackie & Singla 1983; Leys et al. 1999) and the response spreads through the whole sponge. However, the main difference between syncytial hexactinellids, compared to the other sponges (cellular tissues), is the velocity of the signal propagation, which is generally much higher (e.g. from 4 to 350 mm s<sup>-1</sup> in Ephydatia muelleri (Demospongiae), compared to approximately 0.26-0.28 cm s<sup>-1</sup> in R. dawsoni (Hexactinellida). This might be explained by the fact that all attempts to record electrical signals in sponges have so far failed except in this hexactinellid. In R. dawsoni, action potentials have been recorded (Lawn et al. 1981; Leys & Mackie 1997; Leys et al. 1999) through the trabecular syncytium. The conduction velocity of 0.27 cm s<sup>-1</sup> is slow compared with conduction in nerves, whereas the absolute and relative refractory periods (29 and 150 seconds, respectively) are very long. This electrical conduction is temperature sensitive. Together with drug treatment experiments, this observation led the authors to hypothesize the involvement of calcium channels (instead of sodium channels) (Leys et al. 1999).

To date, action potentials have not been recorded in other sponges, but Tompkins-MacDonald *et al.* (2009) report for the first time the physiological study of inwardrectifier K<sup>+</sup> (Kir) channels in *Amphimedon queenslandica* (Demospongiae). The authors emphasize their conserved fundamental properties of ion selectivity, block and rectification. They hypothesize that cells possessing such channels (not identified so far) should be able to maintain a stable resting potential and to sustain prolonged depolarization of their membrane without massive loss of internal K<sup>+</sup>.

In conclusion, the molecular, physiological and biochemical data accumulated since the end of the 1990s do not provide an adequate basis to fully understand the

#### E. Renard et al.

mechanisms involved, but it would appear that they are more complex than previously imagined. Cellular, chemical and electrical mechanisms do seem to be involved, as in eumetazoans.

### CANDIDATE SPONGE CELLS FOR NEUROSENSORY-LIKE ROLES

#### In larvae

We referred earlier to the pigmented ciliated cells of the posterior pole of some demosponge parenchymellae envisaged as playing a photoreceptor and effector role at the same time (Leys *et al.* 2002; Maldonado *et al.* 2003). Similar types of multifunctional cells are also found in enidarians and etenophorans where they enable reactivity and coordination without the intervention of neurons (Aerne *et al.* 1991; Hernandez-Nicaise 1991; Nordström *et al.* 2003). Some authors thus propose that in the Urmetazoa, assumed to have a limited number of cell types, multifunctionality of cells would have been frequent, and that segregation of cell functions evolved together with gene duplications and functional divergence (Arendt 2008).

Nevertheless, the ring organization of the posterior pigmented ciliated cells is characteristic only for parenchymella larvae of some demosponge orders, such as Haplosclerida and Dictyoceratida (Ereskovsky 2005; Maldonado 2006), whereas in other orders the pigmented cells are not organized as a ring, and in other larval types a uniform color is observed. However, all these larvae show responses to various stimuli, including light (Boury-Esnault et al. 2003; Elliott et al. 2004; Gonobobleva & Ereskovsky 2004; Uriz et al. 2008). When pigmented cells are present they are assumed to be responsible for light sensitivity, but in view of the variety of stimuli to which larvae are able to react, other cell types might be involved. New candidate cells were recently proposed on the basis of biochemical and molecular data: (i) serotonergic archeocytes, which were discovered for the first time in the inner part of the parenchymella of Tedania ignis Duchassaing & Michelotti, 1864 (Weyrer et al. 1999); and (ii) "flask cells" of the larva of A. queenslandica (Fig. 3A). These cells

Figure 3 Transmission electron micrographs (TEM) of sponge larval cell types - putative candidates for sensory roles. (A) the flask cells of Amphimedon queenslandica (Demospongiae, Haplosclerida), arrowhead - cilium (from: Leys & Degnan 2001); (B) the globular flagellated cell of Haliclona tubifera (Demospongiae, Haplosclerida) (from: Woollacott 1993); (C) the vesicular cells of Haliclona sp. (Demospongiae, Haplosclerida) (from: Amano & Hori 1994); (D) the "bottle cell" of calciblastula of Soleneiscus sp. (Calcinea, Calcispongia) (from: Amano & Hori 2001); (E) the cruciform cells (CrC) of amphiblastula of Scypha ciliata (Calcaronea, Calcispongiae) (from: Franzen 1988); (F) the non-ciliated ovoid vacuolar cells in cinctoblastula of Oscarella tuberculata: arrow - (Homoscleromorpha); inset - vesicles within the cytoplasm of vacuolar cell.

Abbreviations: Ci, cilium, G, Golgi complex, M, membranous structures, N, nucleus, V, vacuole, VC, vesicular cytoplasm. Scale bar: A, 2  $\mu$ m, B, 2  $\mu$ m, C, 3  $\mu$ m, D, 2  $\mu$ m, E, 2  $\mu$ m, F, 2  $\mu$ m, inset, 0.5  $\mu$ m.

300



Origin of the neuro-sensory system

express simultaneously five messengers corresponding to post-synaptic genes, leading the authors to suggest they might play neuro-sensory-like roles (Sakarya et al. 2007). Richards et al. (2008) show that flask cells (reported by authors as "globular cells") express three genes that are important in the nervous system patterning of Eumetazoa: AmqbHLH1, a gene with conserved proneural activity and its supposed (according to the eumetazoan Notch pathway) upstream regulators AmgNotch and AmaDelta1. Flask cells show remarkable ultrastructural features: they have a clear apico-basal polarity, a general bottle shape and a cilium (Fig. 3A) (Leys & Degnan 2001). Nevertheless, unlike typical ciliated cells, neither a longitudinal or horizontal rootlet nor an accessory centriole is associated with their basal body, which rules out a locomotor role and, therefore, might reflect a sensory role (Woollacott 1993; Leys & Degnan 2001). In parenchymellae of other demosponge species, cells with similar ultrastructure are present, although not always ciliated. Whether ciliated or not, one of the noteworthy peculiarities of these flask cells is the abundance of small vesicles and membranous tubules in the cytoplasm that are reminiscent of synthesis-exocytosis of molecules. It should be stressed that cell types sharing a characteristic bottle or oval shape and a large quantity of small electron transparent vesicles and membranous structures (with or without cilia) are in fact found in nearly all sponge larvae, but the variety of names renders comparison difficult in the literature: globular flagellated cells (Fig. 3B) (Woollacott 1993), vesicular cells (Fig. 3C) (Amano & Hori 1994), flask-like cells (Maldonado 2006), vacuolar cells (Lévi 1964) and urn-shaped cells (Boury-Esnault 1976) in Demospongiae; the bottle cells in calcinean Calcispongia (Fig. 3D) (Amano & Hori 2001; Ereskovsky & Willenz 2008); cruciform cells in calcarean Calcispongia (Fig. 3E) (Duboscq & Tuzet 1938; Franzen 1988; Gallissian & Vacelet 1992; Amano & Hori 1992); and non-ciliated ovoid vacuolar cells in Homoscleromorpha (Fig. 3F) (Boury-Esnault et al. 2003; De Caralt et al. 2007). We do not suggest that all these cell types are homologous to flask cells, but the sharing of abundant vesicles is reminiscent of a capacity for synthesis and exocytosis of chemicals (Woollacott 1993; Amano & Hori 1994; Leys & Degnan 2001). Together with the interesting results of Sakarya et al. (2007) and Richards et al. (2008), this suggests that it might be worth paying particular attention to these microvesicle-rich cells when exploring neuro-sensory-like functions in sponge larvae.



Figure 4 Choanocytes and choanocyte chambers of Oscarella lobularis (Homoscleromorpha). Ultrastructure: TEM (A) and SEM (B) of the choanocytes. C, D, *In situ* hybridization pattern in O. lobularis. Expression pattern of the gene OlobNK observed on sections at low magnification, only choanocyte chambers (CCh) are stained (from: Gazave et al. 2008).

Abbreviations: C, choanocyte, F, flagellum, Me, mesohyl, Mv, microvilli, N, nucleus. Scale bar: A, 2 μm, B, 5 μm, C, 250 μm, D, 40 μm.

© 2009 ISZS, Blackwell Publishing and IOZ/CAS

301

#### In adults

Apart from the controversial bipolar cells described by Pavans de Ceccatty (1966) in the mesohyl of Tethya, no cells with obvious ultrastructural features reminiscent of eumetazoan neuro-sensory cells have been reported. Therefore, adult sponges are considered to be devoid of specialized conduction cells. Different types of pigmented cells are present in adult sponges, but without evidence of sensory functions, whereas flask-like cells have not been reported. Nevertheless, an emerging hypothesis proposes choanocytes as potential sensor-effector cells (Fig. 4A, B). Their ultrastructure is quite similar to that of eumetazoan mechanoreceptors so that Jacobs et al. (2007) suggest that collar cells might represent the cell type that gave rise to eumetazoan sensory cells. Even if this hypothesis is consistent with the view of an ancestral multifunctionality (i.e. crucial role of choanocytes in nutrition and reproduction) giving rise secondarily to separated specific cell functions (Arendt 2008), common ancestrality of cell lineage would be difficult to demonstrate. Even if possible co-option or secondary loss of functions cannot be ruled out, the conservation of several gene expression patterns (together with other data) might provide clues to potential common ancestrality. Only two genes with choanocyte-associated expression have been reported so far:

1. Annexin in Ephydatia fluviatilis L., 1759 (Demospongiae) is expressed in archeocytes differentiating in choanocytes during dissociation/reaggregation experiments (Funayama *et al.* 2005). Interestingly, Annexin genes encode a family of proteins with numerous roles all involving interactions with cell membranes and activity regulation by cytosolic  $[Ca^{2+}]$  (Futter & White 2007).

2. A NK<sub>6,7</sub>-related gene has been shown to be expressed strictly in choanocytes of the Homoscleromorpha *Oscarella lobularis* Schmidt, 1862 (Gazave *et al.* 2008). The authors draw our attention to the fact that NK<sub>6</sub> and NK<sub>7</sub> families have a predominantly neural expression pattern in bilaterians (Fig. 4C,D).

This is far from sufficient to test Jacobs' hypothesis, but these first results must be kept in mind for further essay investigations. Nevertheless, considering the internal position of choanocytes, the proposition of Jacobs *et al.* (2007) to consider these cells as possible sensors can only be valid for water change perception; they can hardly be involved in responses to external stimuli. Therefore, other cell types might be proposed: for example, pinacocytes that are directly exposed to the environment. Of note is that pinacocytes and choanocytes are the two most immunolabeled cell types in the experiments of Ramoino *et al.* (2007). The expression of GABA receptors in cells in direct contact with the medium, together with the increase in GABA release after K<sup>+</sup>-induced membrane depolarization, has led the authors to suggest that these cells are able to respond to chemical stimuli.

Of course, proof is lacking for all the cells formerly hypothesized as candidates for neuro-sensory functions (posterior pigmented cells and flask-cells in larvae; and choanocytes and pinacocytes in adults). It will be necessary, in the coming years, to obtain a larger set of physiological and molecular data to test these new and challenging hypotheses.

### **CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES**

Over the past 20 years, our knowledge concerning sponge features at molecular, biochemical, histological and physiological levels has greatly increased. For conduction mechanisms as well as other aspects of sponges, it has become more and more obvious that these animals are not as simple as generally described in zoological textbooks. The absence of neurons and obviously identified sensory cells does not indicate the absence of an efficient perception-conduction system enabling adaptive responses to environmental changes. On the basis of the data surveyed in this review, it should be obvious that sponges are not devoid of sensory cells, and use cellular, chemical and/or electrical signals to coordinate their activities, even if we have still got a long way from identifying all the cells and understanding the whole processes involved. This is partly due to the fact that sponges are not always convenient animals for all classical experimentation methods, such as physiological experiments, calling for the time consuming adaptation of protocols. It is to be expected that more and more molecular data might favor comparison with the Eumetazoa, providing clues to putative conserved mechanisms that might be involved in the patterning or functioning of sponge conducting systems. From the functional point of view, post-synaptic orthologous gene expression patterns are still being studied (Sakarya et al. 2007), providing us with interesting new hypotheses regarding the cells that might be involved in larvae. It would also be worth studying their expression in adults. We detected in our expressed sequence tag (EST) dataset of O. lobularis various genes that are known to be implicated in eumetazoans in the regulation of vesicle formation and exocytosis, in particular during neurotransmitter emission. We hope that the expression patterns of these genes under various conditions, in both larvae and adults, will give us insights into the cells concerned. Concerning the body plan patterning genes, several genes known to play a role in nervous system differentiation have been reported in sponges: *Frizzled* (Adell *et al.* 2003); *Sox* (Jager *et al.* 2006); *Pax* (for review see Kozmik 2008); *NK*<sub>6,7</sub> (Gazave *et al.* 2008; Larroux *et al.* 2006); *bHLH* (Richard *et al.* 2008; Simionato *et al.* 2007); and *Tlx* apparented genes (Coutinho *et al.* 2003; Larroux *et al.* 2006; Richelle-Maurer *et al.* 2006). Nevertheless, expression data remain scarce and are not always easy to compare to data from eumetazoans. Even if we are all aware that conserved coexpression of genes is not sufficient to permit doubt-free homology assignation to known eumetazoan cell types, these data will help us (together with other data) to propose new candidate cells and hypotheses to be tested.

As well as other non-bilaterian models, sponges have been neglected for many years and do merit their recent "rehabilitation". In the light of recent results, in the context of a more integrated view of eukaryote evolution, where one may dare to speak of "neurobiology" in plants (Brenner *et al.* 2006), we may expect that in the future a better understanding of perception and signal conduction mechanisms in sponges will lead the zoological community to question the appropriate criteria for referring to a nervous system: is the historical "presence of neurons" necessary and sufficient? We hope that this review may serve to convince the reader that despite their lack of identified neuroid cells, sponges are promising models for understanding the origin of the neuro-sensory system in the animal lineage.

### ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the assistance of Chantal Bézac (Centre d'Océanologie de Marseille, France) and Daria Tokina (Zoological Institute, St. Petersburg, Russia) for their technical help in microscopic preparation and observations. We also thank Michael Paul for helpful correction of the English. This work was partly supported by the following programs: the Russian Foundation for Basic Research (RFBR No. 09-04-00337) and the European Marie Curie Mobility program (Fellowship of A. Ereskovsky, MIF1-CT-2006-040065). We thank the organizers of the XX International Congress of Zoology (2008) for having allowed us to present our talk and the International Society of Zoological Sciences for offering us the possibility of submitting this paper for publication.

### REFERENCES

Adell T, Nefkens I, Müller WE (2003). Polarity factor 'Frizzled' in the demosponge *Suberites domuncula*: Identification, expression and localization of the receptor in the epithelium/pinacoderm. *FEBS Letters* **554**, 363–8.

- Aerne BL, Stidwill RP, Tardent P (1991). Nematocyte discharge in hydra does not require the presence of nerve cells. *Journal of Experimental Zoology* 258, 137–41.
- Amano S, Hori I (1992). Metamorphosis of calcareous sponges. I. Ultrastructure of free-swimming larvae. Invertebrate Reproduction and Development 21, 81–90.
- Amano S, Hori I (1994). Metamorphosis of a demosponge I. Cells and structure of swimming larva. *Invertebrate Reproduction and Development* 25, 193–204.
- Amano S, Hori I (2001). Metamorphosis of coeloblastula performed by multipotential larval flagellated cells in the calcareous sponge *Leucosolenia laxa*. *Biological Bulletin* 200, 20–32.
- Aouacheria A, Geourjon C, Aghajari N, Navratil V, Deléage G, Lethias C, Exposito JY (2006). Insights into early extracellular matrix evolution: Spongin short chain collagen-related proteins are homologous to basement membrane type IV collagens and form a novel family widely distributed in invertebrates. *Molecular Biology* and Evolution 23, 2288–302.
- Arendt D (2008). The evolution of cell types in animals: emerging principles from molecular studies. *Nature Reviews Genetics* 9, 868–82.
- Bagby RM (1966). The fine structure of myocytes in the sponges *Microciona prolifera* (Ellis and Sollander) and *Tedania ignis* (Duchassaing and Michelotti). *Journal* of Morphology **118**, 167–82.
- Bergquist PR, Sinclair ME (1968). The morphology and behaviour of larvae of some intertidal sponges. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 2, 426–37.
- Bonasoro F, Wilkie IC, Bavestrello G, Cerrano C, Candia Carnavali MD (2001). Dynamic structure of the mesohyl in the sponge *Chondrosia reniformis* (Porifera, Demospongiae). *Zoomorphology* 121, 109–21.
- Bond C, Harris AK (1988). Locomotion of sponges and its physical mechanism. *Journal of Experimental Zool*ogy 246, 271–84.
- Borchiellini C, Manuel M, Alivon E, Boury-Esnault N, Vacelet J, Le Parco Y (2001). Sponge paraphyly and the origin of Metazoa. *Journal of Evolutionary Biology* 14, 171–9.
- Borchiellini C, Chombard C, Manuel M, Alivon E, Vacelet J, Boury-Esnault N (2004). Molecular phylogeny of Demospongiae: Implications for classification and sce-

#### E. Renard et al.

narios of character evolution. *Molecular Phylogenetics* and Evolution **32**, 823–37.

- Boury-Esnault N (1976). Ultrastructure de la larve parenchymella d'Hamigera hamigera (Schmidt) (Demospongiae, Poecilosclerida). Origine des cellules grises. Cahiers de Biologie marine 17, 9–20.
- Boury-Esnault N, Ereskovsky AV, Bezac C, Tokina D (2003). Larval development in Homoscleromorpha (Porifera, Demospongiae) first evidence of basal membrane in sponge larvae. *Invertebrate Biology* 122, 187–202.
- Boute N, Exposito JY, Boury-Esnault N et al. (1996). Type IV collagen in sponges, the missing link in basement membrane ubiquity. *Biology of the Cell* 88, 37–44.
- Brenner ED, Stahlberg S, Mancuso S, Vivanco J, Baluska F and Van Volkenburgh E (2006). Plant neurobiology: An integrated view of plant signaling. *TRENDS in Plant Science* 11, 413-9.
- Coutinho CC, Fonseca RN, Mansurea JJC, Borojevic R (2003). Early steps in the evolution of multicellularity: Deep structural and functional homologies among homeobox genes in sponges and higher metazoans. *Mechanism of development* **120**, 429–440.
- De Caralt S, Uriz MJ, Ereskovsky AV, Wijffels RH (2007). Embryo development of *Corticium candelabrum* (Demospongiae: Homosclerophorida). *Invertebrate Biology* **126**, 211–19.
- 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. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America* 103, 8751–6.
- De Salle R, Schierwater B (2008). An even "newer" animal phylogeny. *Bioessays* 30, 1043–7.
- De Vos L, Van de Vyver G (1981). Etude de la contraction spontanée chez l'éponge d'eau douce *Ephydatia fluviatilis* cultivée *in vitro*. *Annales de la Société royale zoologique de Belgique* **111**, 21–31.
- Dohrmann M, Janussen D, Reitner J, Collins AG, Worheide G (2008). Phylogeny and evolution of glass sponges (Porifera, Hexactinellida). Systematic Biology 57, 388– 405.
- Duboscq O, Tuzet O (1938). L'origine et l'évolution des cellules en croix des éponges calcaires. *Travaux de la Station zoologique de Wimereux* 13, 267–77.
- Dunn CW, Hejnol A, Matus DQ et al. (2008). Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452, 745–9.

- Elliott GRD, Macdonald TA, Leys SP (2004). Sponge larval phototaxis: A comparative study. *Bollettino dei Musei e degli Istituti biologici dell'Universita di Genova* **68**, 291–300.
- Elliott GRD, Leys SP (2007). Coordinated contractions effectively expel water from the aquiferous system of a freshwater sponge. *The Journal of Experimental Biol*ogy 210, 3736–48.
- Ellwanger K, Nickel M (2006). Neuroactive substances specifically modulate rhythmic body contractions in the nerveless metoazoon *Tethya wilhelma* (Demospongiae, Porifera). *Frontiers in Zoology* **3**, 7.
- Ellwanger K, Eich A, Nickel M (2007). GABA and glutamate specifically induce contractions in the sponge *Tethya* wilhelma. Journal of Comparative Physiology A Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology **193**, 1–11.
- Emson RH (1966). The reactions of the sponge *Cliona celata* to applied stimuli. *Comparative Biochemistry and Physiology* **18**, 805–27.
- Ereskovsky AV, Tokina DB (2004). Morphology and fine structure of the swimming larvae of *Ircinia oros* (Porifera, Demospongiae, Dictyoceratida). *Invertebrate Reproduction and Development* **45**, 137–50.
- Ereskovsky AV (2005). Comparative embryology of Sponges (Porifera). Saint-Petersburg University Press, Saint-Petersburg.
- Ereskovsky AV, Tokina DB (2007). Asexual reproduction in homoscleromorph sponges (Porifera; Homoscleromorpha). *Marine Biology* **151**, 425–34.
- Ereskovsky AV, Willenz P (2008). Larval development in *Guancha arnesenae* (Porifera, Calcispongiae, Calcinea). Zoomorphology 127, 175–87.
- Ereskovsky AV, Borchiellini C, Gazave E *et al.* (2009). The Homoscleromorph sponge *Oscarella lobularis*, a promising sponge model in evolutionary and developmental biology. *BioEssays* **31**, 89–97.
- Exposito JY, Garrone R (1990). Characterization of a fibrillar collagen gene in sponges reveals the early evolutionary appearance of two collagen gene families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 6669–73.
- Franzen W (1988). Oogenesis and larval development of Scypha ciliata (Porifera, Calcarea). Zoomorphology 107, 349–57.
- Funayama N, Nakatsukasa M, Hayashi T, Agata K (2005). Isolation of the choanocyte in the fresh water sponge, *Ephydatia fluviatilis* and its lineage marker, *Ef Annexin*.

Development Growth Differentiation 47, 243–53.

- Futter CE, White IJ (2007). Annexins and endocytosis. *Traffic* **8**, 951–8
- Gallissian MF, Vacelet J (1992). Ultrastructure of the oocyte and embryo of the calcified sponge, *Petrobiona massiliana* (Porifera, Calcarea). *Zoomorphology* **112**, 133–41.
- Garrone R, Lethias C, Escaig J (1980). Freeze-fracture study of sponge cell membranes and extracellular matrix. Preliminary results. *Biologie cellulaire* **38**, 71–4.
- Gazave E, Lapébie P, Renard E et al. (2008). NK homeobox genes with choanocyte-specific expression in homoscleromorph sponges. *Developmental Genes and Evolution* 218, 79–89.
- Gonobobleva EL, Ereskovsky AV (2004). Metamorphosis of the larva of *Halisarca dujardini* (Demospongiae, Halisarcida). *Bulletin de l'Institut royal des Sciences naturelles de Belgique, Biologie* **74**, 101–15.
- Green CR, Bergquist PR (1979). Cell membrane specializations in the Porifera. In: Lévi C, Boury-Esnault N, eds. *Biologie des spongiaires*. Editions du C.N.R.S. 291, Paris, pp.153–8.
- Guerriero A, Dambrosio M, Pietra F, Debitus C, Ribes O (1993). Pteridines, sterols, and indole derivatives from the lithistid sponge *Corallistes undulatus* of the coral sea. *Journal of Natural Products* **56**, 1962–70.
- Haeckel E (1874). Die Gastraea-Theorie, die phylogenetische Classification des Thierreichs und die Homologie der Keimblätter. Zeitschrift für Naturwissenshaft 8, 1–55.
- Hernandez-Nicaise ML (1991). Ctenophora. In: Harrison W, ed. *Microscopic Anatomy of the Invertebrates*. Volume II: Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora. Wiley-Liss, New York, pp. 359–418.
- Hooper JNA, Van Soest RWM ed. (2002). Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Jacobs DK, Nakanishi N, Yuan D, Camara A, Nichols SA, Hartenstein V (2007). Evolution of sensory structures in basal metazoa. *Integrative and Comparative Biol*ogy 47, 712–23.
- Jager M, Queinnec E, Houliston E, Manuel M (2006). Expansion of the SOX gene family predated the emergence of the Bilateria. *Molecular Phylogenetics* and Evolution 39, 468–77.
- Jager M, Queinnec E, Chiori R, Le Guyader H, Manuel M. (2008). Insights into the Early Evolution of *SOX* Genes From Expression Analyses in a Ctenophore. *Journal of*

*Experimental Zoology* (Part B: Molecular and developmental evolution) **310B**, 650–67.

- Jones CW (1962). Is there a nervous system in sponges? Biological Reviews 37, 1–50.
- Kozmik Z (2008). The role of *Pax* genes in eye evolution. *Brain Research Bulletin* **75**, 335–9.
- Labat-Robert J, Auger RL, Lethias C, Garrone R (1981). Fibronectin-like protein in Porifera: Its role in cell aggregation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 78, 6261–65.
- Larroux C, Fahey B, Liubicich D (2006). Developmental expression of transcription factor genes in a demosponge: insights into the origin of metazoan multicellularity. *Evolution & Development* 8, 150–73.
- Lawn ID, Mackie GO, Silver G (1981). Conduction system in a sponge. *Science* **211**, 1169–71.
- Ledger PW (1975). Septate junctions in the Calcareous sponge Sycon ciliatum. Tissue and Cell 7, 13–18.
- Lentz TL (1966). Histochemical localization of neurohumors in a sponge. *Journal of Experimental Zoology* 162, 171–80.
- Lethias C, Garrone R, Mazzorana M (1983). Fine structure of sponge cell membranes: Comparative study with freeze-fracture and conventional thin section methods. *Tissue and Cell* **15**, 523–35.
- Lévi C (1964). Ultrastructure de la larve parenchymella de démosponge. I. Mycale contarenii. Cahiers de Biologie marine 5, 97–104.
- Leys SP, Mackie GO (1997). Electrical recording from a glass sponge. *Nature* 387, 29–30.
- Leys SP, Mackie GO, Meech RW (1999). Impulse conduction in a sponge. *Journal of Experimental Biology* 202, 1139–50.
- Leys SP, Degnan BM (2001). Cytological basis of photoresponsive behavior in a sponge larva. *Biological Bulletin* 201, 323–38.
- Leys SP, Cronin TW, Degnan BM, Marshall JN (2002). Spectral sensitivity in a sponge larva. *Journal of Comparative Physiology* [A] 188, 199–202.
- Leys SP, Tompkins GJ (2005). Glass sponges arrest pumping in response to increased sediment loads. In: *Society for Integrative and Comparative Biology Annual Meeting Program*, San Diego, California, 4–8 January 2005. Society for Integrative and Comparative Biology, McLean, Va. No. P1.117, pp. 305.
- Leys SP, Meech RW (2006). Physiology of coordination in sponges. Canadian Journal of Zoology 84, 288–

E. Renard et al.

306.

- Lieberkühn N (1859). Neue Beitrage zur Anatomie der Spongien. Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin 353–82.
- Mackie GO (1979). Is there a conduction system in sponges? In: Lévi C, Boury-Esnault N, eds, *Biologie* des Spongiaires. Editions du C.N.R.S. Paris 291, 145– 52.
- Mackie GO (1990). The elementary nervous system revisited. *American Zoologist* 30, 907–20.
- Mackie GO, Singla CL (1983). Studies on hexactinellid sponges. In: *Histology of Rhabdocalyptus dawsoni* (Lambe, 1873). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **301**, 365–400.
- Maldonado M, Young C (1999). Effects of the duration of larval life on postlarval stages of the demosponge *Sigmadocia coerulea*. *Journal of experimental marine Biology and Ecology* **232**, 9–21.
- Maldonado M, Durfort M, McCarthy DA, Young CM (2003). The cellular basis of photobehavior in the tufted parenchymella larva of demosponges. *Marine Biology* 143, 427–41.
- Maldonado M (2006). The ecology of the sponge larva. Canadian Journal of Zoology 84, 175–94.
- Medina MN, Collins AG, Silberman JD, Sogin ML (2001). Evaluating hypothesis of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9707–12.
- Merejkowsky CD (1878). Les éponges de la mer Blanche. Mémoires de l'Académie impériales des Sciences de St Petersbourg 26, 1–51.
- Mitzopolitanskaya RL (1941). On the presence of acetylcholine and cholinesterase in the Protozoa, Spongia and Coelenterata. *Academy of Sciences of Moscow* **3**, 717–8.
- Müller WE, Schröder HC, Skorokhod A, Bünz C, Müller IM, Grebenjuk VA (2001). Contribution of sponge genes to unravel the genome of the hypothetical ancestor of Metazoa (Urmetazoa). *Gene* 276, 161–73.
- Müller WE, Wiens M, Adell T, Gamulin V, Schröder HC, Müller IM (2004). Bauplan of Urmetazoa: basis for genetic complexity of Metazoa. *International Review* of Cytology 235, 53–92.
- Nichols SA (2005). An evaluation of support for orderlevel monophyly and interrelationships within the class Demospongiae using partial data from the large sub-

unit rDNA and cytochrome oxidase subunit I. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **34**, 81–96.

- Nichols SA, Dirks W, Pearse JS, King N (2006). Early evolution of animal cell signaling and adhesion genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 2451–56.
- Nickel M (2001). Cell biology and biotechnology of marine invertebrates - sponges (Porifera) as model organisms. *Arbeiten und Mitteilungen aus dem Biologischen Institut der Universität Stuttgart* **32**, 1–15
- Nickel M, Brummer F (2003). In vitro sponge fragment culture of Chondrosia reniformis (Nardo, 1847). Journal of Biotechnology 100, 147–59.
- Nickel M (2004). Kinetics and rhythm of body contractions in the sponge *Tethya wilhelma* (Porifera: Demospongiae). *The Journal of Experimental Biology* 207, 4515–24.
- Nickel M (2006). Like a 'rolling stone': quantitative analysis of the body movement and skeletal dynamics of the sponge *Tethya wilhelma*. *The Journal of Experimental Biology* **209**, 2839–46.
- Nielsen C (2008). Six major steps in animal evolution: are we derived sponge larvae? *Evolution & Development* 10, 241–57.
- Nordström K, Wallén R, Seymour J, Nilsson D (2003). A simple visual system without neurons in jelly fish larvae. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain) 270, 2349–54.
- Pancer Z, Kruse M, Müller I, Müller WEG (1997). On the origin of metazoan adhesion receptors: Cloning of integrin α subunit from the sponge *Geodia cydonium*. *Molecular Biology and Evolution* 14, 391–9.
- Pang K, Martindale M (2008). Developmental expression of homeobox genes in the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*. *Developmental Genes and Evolution* 218, 307– 19.
- Pansini M, Pronzato R (1990). Observations on the dynamics of a Mediterranean sponge community. In: Rützler K, ed. New Perspectives in Sponge Biology. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. pp. 404–15.
- Pantin CFA (1952). The elementory nervous system. Proceeding of the Royal Society of London B 140, 147–68.
- Parker GH (1910). The reactions of sponges, with a consideration of the origin of the nervous system. *Journal* of Experimental Zoology 8, 765–805.
- Pavans de Ceccatty M, Gargouil M, Coraboeuf E (1960).

Les réactions motrices de l'éponge *Tethya lyncurium* (Lmk.) à quelques stimulations expérimentales. *Vie et Milieu* **11**, 594–600.

- Pavans de Ceccatty M (1966). Ultrastructures et rapport des cellules mésenchymateuses de type nerveux de l'éponge *Tethya lyncurium* (Lamark). *Annales des Sciences naturelles, Biologie Animale* 8, 577–614.
- Pavans de Ceccatty M (1974). Coordination in sponges. The foundations of integration. *American Zoologist* 14, 895–903.
- Pavans de Ceccatty M (1979). Cell correlations and integrations in sponges. In: Lévi C, Boury-Esnault N, eds, *Biologie des Spongiaires*. Editions du CNRS, Paris 291, pp. 123–35.
- Pavans de Ceccatty M (1989). Les éponges, à l'aube des communications cellulaires. Pour la Science 142, 64–72.
- Perović S, Krasko A, Prokic I, Müller IM, Müller WEG (1999). Origin of neuronal-like receptors in Metazoa: cloning of a metabotropic glutamate/GABA-like receptor from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Cell and Tissue Research* 296, 395–404.
- Pfannkuchen M, Fritz G, Schlesinger S, Bayer K, Brümmer F (2008). In situ pumping activity of the sponge Aplysina aerophoba, Nardo 1886. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 369, 65–71.
- Philippe H, Derelle R, Lopez P et al. (2009). Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships. *Current Biology* 19, 1–7.
- Pronzato R (2004). A clumber sponge. Bolletino Museum Institute dei Biologia Universita di Genova 68, 549–52.
- Ramoino P, Gallus L, Paluzzi S et al. (2007). The GABAergic-Like System in the marine Demosponge Chondrilla Nucula. Microscopy Research and Technique 70, 944– 51.
- Reiswig HM (1971). In situ pumping activities of tropical Demospongiae. Marine Biology 9, 38–50.
- Reiswig HM (1979). Histology of Hexactinellida (Porifera). In: Lévi C, Boury-Esnault N, eds, *Biologie des Spongiaires*. Editions du CNRS Paris 291, pp. 173–80.
- 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. *Current Biology* 18, 1156–61.
- Richelle-Maurer E, Boury-Esnault N et al. (2006). Conservation and Phylogeny of a Novel Family of Non-Hox Genes of the Antp Class in Demospongiae (Porifera). Journal of Molecular Evolution 63, 222–30.

Sakarya O, Armstrong KA, Adamska M et al. (2007). A

© 2009 ISZS, Blackwell Publishing and IOZ/CAS

Post-Synaptic Scaffold at the Origin of the Animal Kingdom. *PLoS ONE* **2** (6:e506 doi:10.1371/journal. pone.0000506).

- Sarà M (1990). Australian *Tethya* (Porifera, Demospongiae) from the Great Barrier Reef with description of two new species. *Bollettino di Zoologia* **57**, 153–7.
- Sarà M, Manara E (1991). Cortical structure and adaptation in the genus *Tethya* (Porifera, Demospongiae). In: Reitner J, Keupp H, eds. *Fossil and Recent Sponges*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 306–12.
- Schäcke H, Schröder HC, Gamulin V, Rinkevich B, Müller I, Müller WEG (1994). Molecular cloning of a tyrosine kinase gene from the marine sponge *Geodia cydonium*: A new member belonging to the receptor tyrosine kinase class II family. *Molecular Membrane Biology* 11, 101–7.
- Schierwater B. My favourite animal, *Trichoplax adhaerens*. *Bioessays* 27: 1294–302
- Schierwater B, Eitel M, Jakob W et al. (2009). Concatenated analysis sheds light on early Metazoan evolution and fuels a modern 'Urmetazoon' hypothesis. PLoS Biology 7, 0036–44.
- Schmidt O (1866) Zweites Supplement der Spongien des Adriatischen Meeres enthaltend die Vergleichung der Adriatischen und Britischen Spongiengattungen. Verlag von Wilhelm Engelmann Leipzig, 1–23.
- Simionato E, Ledent V, Richards G et al. (2007). Origin and diversification of the basic helix-loop-helix gene family in metazoans: Insights from comparative genomics. BMC Evolutionary Biology 7, 33.
- Simpson TL (1984). *The Cell Biology of Sponges*. Springer Verlag, New York.
- Sollas WJ (1884). On the origin of fresh water faunas: a study in evolution. *Transactions of the Royal Society* of Dublin 2, 87–118.
- Sperling EA, Pisani D, Peterson KJ (2007). Poriferan paraphyly and its implications for Precambrian palaeobiology. *Geological Society of London, Special Publications* 286, 355–68.
- Srivastava M, Begovic E, Chapman J et al. (2008). The Trichoplax genome and the nature of placozoans. Nature 454, 955–60.
- Thiney Y (1972). Morphologie et cytochimie ultrastructurale de l'oscule d'Hippospongia communis LMK et de sa régénération, Université Claude Bernard (Lyon I), pp. 1–63.
- Tompkins-MacDonald GJ, Gallin WJ, Sakarya O, Degnan B, Leys SP and Boland LM (2009). Expression of a poriferan potassium channel: insights into the evolution

E. Renard et al.

of ion channels in metazoans. *The Journal of Experimental Biology* **212**, 761–7.

- Uriz MJ, Turon X, Mariani S (2008). Ultrastructure and dispersal potential of sponge larvae: tufted versus evenly ciliated parenchymellae. *Marine Ecology* 29, 280–97.
- Wang X, Lavrov DV (2008). Seventeen new complete mtDNA sequences reveal extensive mitochondrial genome evolution within the demospongiae. *PLoS ONE* 3, (doi:10.1371/journal.pone.0002723): e2723.
- Wapstra M, Soest van RWM (1987). Sexual reproduction, larval morphology and behaviour in Demosponges from the southwest of the Netherlands. In: Vacelet J, Boury-Esnault N eds, *Taxonomy of Porifera*. Springer, Berlin, pp. 281–307.
- Warburton FE (1966). The behavior of sponge larvae. Ecology 47, 672–4.
- Weissenfels N (1983). Bau und Funktion des Süßawasserschwamms *Ephydatia fluvialis* (Porifera).
  X. Der Nachweis des offenen Mesenchyms durch Verfütterung von Böckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Zoomorphology 103, 15–23.

- Weissenfels N (1990). Condensation rhythm of fresh-water sponges (Spongillidae, Porifera). European Journal of Cell Biology 53, 373–83.
- Weyrer S, Rützler K, Rieger R (1999). Serotonin in Porifera? Evidence from developing *Tedania ignis*, the Caribbean fire sponge (Demospongiae). *Memoirs of the Queensland Museum* 44, 659–65.
- Wimmer W, Perovic S, Kruse M, Schröder HC, Krasko A, Batel R, Müller WE (1999). Origin of the integrinmediated signal transduction. Functional studies with cell cultures from the sponge Suberites domuncula. European journal of biochemistry/ FEBS 260, 156–65.
- Woollacott RM (1993). Structure and swimming behavior of the larva of *Haliclona tubifera* (Porifera, Demospongiae). Journal of Morphology 218, 301–21.
- Zocchi E, Carpaneto A, Cerrano C et al. (2001). The temperature-signaling cascade in sponges involves a heat-gated cation channel, abscisic acid, and cyclic ADP-ribose. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 14859–64.

## **C]** Conclusions et perspectives

L'acquisition des cellules neuro-sensorielles et leur organisation en un système nerveux coordonné est un événement crucial de l'évolution des métazoaires (Miller, 2009). La morphologie et la structure du système nerveux ainsi que les gènes impliqués dans sa mise en place et dans son fonctionnement sont bien connus chez de nombreux bilatériens. Actuellement, les recherches s'intensifient chez divers modèles cnidaires permettant ainsi une étude comparative à l'échelle des eumétazoaires. Elles révèlent une très grande conservation des circuits génétiques associés au système nerveux (Galliot et al., 2009). Les éponges sont extérieures aux eumétazoaires et ne possèdent pas de système nerveux. Une approche comparative entre éponges et eumétazoaires est donc particulièrement adaptée pour comprendre comment a pu se mettre en place le système nerveux et en premier lieu la cellule neurosensorielle : par co-option d'éléments préexistants pour assurer une nouvelle fonction, par apparition de novo d'éléments ou par assemblage d'éléments préexistants. L'article précédent rassemble les données collectées sur les éponges et montre que, malgré l'absence de neurones, des éléments physiologiques (potentiel d'action, neurotransmetteur (Leys et al., 1999 ; Ramoino et al., 2007) et moléculaires (gènes post-synaptiques, voie Notch, gènes bHLH (Sakarya et al., 2007; Simionato et al., 2007; Richards et al., 2008; Tompkins-Macdonald et al., 2009) connus pour être impliqués dans le fonctionnement ou la mise en place du système nerveux des eumétazoaires sont présents chez les éponges. Leur présence est donc ancestrale aux métazoaires mais le manque de données fonctionnelles limite actuellement les hypothèses concernant leurs rôles/mécanismes chez les éponges. Lors de ce travail de thèse, je me suis attachée à identifier certains gènes impliqués dans le système nerveux des eumétazoaires chez le modèle homoscléromorphe Oscarella lobularis via l'étude de facteurs de transcription de la super classe Antennapedia (Chapitre IV) et de la voie de signalisation Notch (Chapitre V).

# CHAPITRE IV

Etude d'un gène à homéoboîte de la super classe Antennapedia (ANTP)



## A] Introduction

### *A.1* : Facteurs de transcription : fonctions et familles

L'émergence de la multicellularité est considérée comme étant un des évènements évolutifs majeurs de la vie sur terre. Cette transition entre état unicellulaire et multicellulaire a été acquise de façon répétée et indépendamment chez les eucaryotes, les bactéries et les archaea via la confluence de facteurs environnementaux, écologiques et génétiques (Figure 31A) (King, 2004; Rokas, 2008a, 2008b). Les organismes multicellulaires ne sont pas une simple superposition de cellules, l'unité fondamentale de tout être vivant (Figure 31B). L'apparition de la multicellularité implique également une communication, une organisation et une coordination entre ces cellules. Chez les embryophytes et les métazoaires, il résulte de ces différenciations et organisations cellulaires complexes l'émergence des organes et leur agencement en plans d'organisation divers. La transition unicellularité/multicellularité requiert des innovations, un répertoire génétique spécifique et les évènements génétiques qui la sous-tendent sont encore très peu connus (Miyata et Suga, 2001 ; Larroux et al., 2006). Cependant, elle est souvent caractérisée par une complexification des familles de gènes impliquées dans les processus clés de croissance, différenciation et développement que sont : l'adhésion cellulaire, la communication cellulaire et la régulation de la transcription (Miyata et Suga, 2001 ; Rokas, 2008a, 2008b). Ainsi, les facteurs de transcription (FT) sont des protéines cruciales pour l'initiation de la transcription chez les eucaryotes. Ce sont des protéines qui se lient à un promoteur de manière à activer ou à inhiber la transcription d'un gène précis. Ils se lient à l'ADN en reconnaissant des séquences spécifiques via un domaine protéique de liaison. Il existe diverses familles de facteurs de transcription définies par quatre types de domaines protéiques: les protéines bHLH (possédant un domaine Hélice-Boucle-Hélice de base); les protéines à doigt à zinc (possédant un domaine en doigt à zinc (zinc finger : ZF)) ; les protéines glissière à leucine (possédant le domaine leucine zipper : LZ) ; les protéines à homéodomaine (possédant un domaine hélice-tour-hélice); les protéines des récepteurs hormonaux intranucléaires (possédant un domaine ZF particulier), (Gilbert, 2006) (Figure 32A). Les facteurs de transcription sont souvent inducteurs et jouent un rôle primordial dans la régulation de l'expression génique. Ils sont synthétisés et/ou activés de



Figure 32 : (A) Les familles de facteurs de transcription présentes chez les métazoaires (Degnan *et al.*, 2009b). (B) Scénarios évolutifs représentant l'évolution des classes de facteurs de transcriptions des métazoaires (gènes à homéoboîtes, *Sox*, *T-box* et *Fox*). B= bilatériens, Ch=choanoflagellés, Cn=cnidaires, LCA= dernier ancêtre commun, M= métazoaires, PDA= ancêtre des protostomiens et des deutérostomiens (Larroux *et al.*, 2008).

manière spécifique dans un tissu donné et/ou à un moment donné du développement et leur action est réversible. Ils sont l'aboutissement de nombreuses cascades de signalisation intracellulaires. Ils ont un rôle prépondérant dans le développement des métazoaires où ils représentent des nœuds de régulation clés dans les réseaux génétiques (Davidson et Erwin, 2006).

## A.2 : Origine et évolution des facteurs de transcription

L'étude comparative des facteurs de transcription identifiés dans les génomes de divers métazoaires basaux (la démosponge Amphimedon queenslandica, les cnidaires Nematostella vectensis et Hydra sp., le placozoaire Trichoplax) et dans le génome du choanoflagellé (Monosiga brevicollis), groupe frère des métazoaires, a révélé des informations importantes quant à la genèse et à l'expansion de ces familles de gènes chez les métazoaires (Figure 32A) (Larroux et al., 2008; Schierwater et al., 2008; Srivastava et al., 2008; Degnan et al., 2009b). L'analyse de la composition en facteurs de transcription du génome Amphimedon queenslandica (ainsi que d'autres éponges) a mis en évidence la présence dans ces lignées de gènes représentatifs de la majorité des familles de facteurs de transcription présentes chez les eumétazoaires, bien que moins diversifiées, tels que les gènes à homéoboîte, les bHLH, les gènes Sox, T-box (Annexe II) et Fox (Figure 32 B) (Jager et al., 2006; Larroux et al., 2006; Nichols et al., 2006; Richelle-Maurer et al., 2006; Larroux et al., 2007; Simionato et al., 2007 ; Gauthier et Degnan, 2008 ; Gazave et al., 2008 ; Larroux et al., 2008). Bien que certaines classes de facteurs de transcription aient une origine plus ancienne (Derelle et al., 2007 ; King et al., 2008 ; Shalchian-Tabrizi et al., 2008 ; Mikhailov et al., 2009), une grande variété de classes et familles de facteurs de transcription sont apparues chez l'ancêtre commun des métazoaires laissant supposer que l'apparition de ces gènes ait été un pré-requis à l'émergence de la multicellularité dans ce taxon (Brooke et Holland, 2003 ; Larroux et al., 2006 ; Larroux et al., 2007 ; Larroux et al., 2008 ; Degnan et al., 2009b). L'émergence de ces gènes s'est apparemment faite de trois manières différentes (Figure 32 B). Certains semblent être apparus de novo chez l'ancêtre commun des métazoaires puisqu'aucun gène apparenté n'a été retrouvé à l'extérieur des animaux (T-box, Fox groupe 1). D'autres familles de facteurs de transcription sont également spécifiques aux métazoaires (synapomorphies) mais
leur origine peut être retrouvée par l'identification d'un gène ancestral commun à ces familles (ANTP, POU, Pax, Six) chez des organismes non métazoaires. Ces familles sont toutes issues de la duplication d'un proto-gène à homéoboîte typique présent chez les opistochontes. D'autres encore sont issus de l'association d'anciens domaines (présents en dehors des animaux) à de nouveaux domaines (présents uniquement chez les animaux), tels que la classe LIM-HD (Figure 32 B) (Larroux *et al.*, 2008 ; Degnan *et al.*, 2009b). Quatre tendances générales peuvent être dégagées de ces études :

(1) La plupart des classes ou familles de facteurs de transcription sont issues d'un proto-gène ancestral aux métazoaires ;

(2) Une première phase de diversification des facteurs de transcription semble avoir eu lieu avant la divergence des éponges et des eumétazoaires ;

(3) Une deuxième phase de diversification des facteurs de transcription aurait eu lieu dans la lignée des eumétazoaires (Kamm et Schierwater, 2006 ; Ryan *et al.*, 2006 ; Putnam *et al.*, 2007) ;

(4) une 3<sup>e</sup> phase d'extension des facteurs de transcription a eu lieu dans la lignée des bilatériens, bien que beaucoup moins intense.

De plus, la conservation de certains de ces facteurs de transcription entre des lignées ayant évolué indépendamment depuis plus de 650 millions d'années laisse supposer que les pressions de sélection agissant sur leur évolution sont très intenses (Degnan *et al.*, 2009b).

# *A.3* : Les gènes à homéoboîte et la super-classe Antennapedia (ANTP) chez les métazoaires basaux

Parmi les plus célèbres des facteurs de transcription, figurent ceux à homéodomaine (HD). Les protéines de cette famille sont caractérisées par un motif de fixation à l'ADN de 60 acides aminés : l'homéodomaine (codé par l'homéoboîte). Ces facteurs de transcription jouent un rôle prépondérant dans diverses fonctions telles que la mise en place des plans d'organisation, la régulation de la détermination, de la différenciation, de l'adhésion et de la migration



Figure (A) Histoire 33 : évolutive des homéodomaines retracée l'arbre des sur (les Eucaryotes deux hypothèses de positionnement de la racine sont mentionnées (Baldauf, 2003)), modifiée d'après (Derelle et al., 2007). Un carré noir représente la présence d'homéodomaine dans le taxon, un blanc son absence. Une branche noire indique la présence incontestable des homéodomaines, une blanche, leur absence. Une branche grise indique que la présence l'absence ou des homéodomaines sont équiparcimonieuses. Dans les deux topologies présentées, l'ancêtre commun des eucaryotes aurait déjà possédé des homéodomaines.

(B) Arbre phylogénétique en maximum de vraisemblance des gènes à homéodomaines de 19 espèces d'eucaryotes.
Quelques noms de gènes bien identifiés sont mentionnés.
(Derelle *et al.*, 2007).

cellulaires lors du développement des métazoaires, mais également des plantes et des fungi (Gehring, 1985 ; Bharathan *et al.*, 1997 ; Derelle *et al.*, 2007). Une analyse des gènes codant pour ces facteurs de transcription à homéodomaine chez une variété d'organismes représentatifs des huit principaux clades d'eucaryotes (Baldauf, 2003) a permis de mieux comprendre l'origine et l'évolution de cette famille de facteurs de transcription. Bien que ces gènes existent chez tous les organismes multicellulaires, cela ne correspondrait pas à une acquisition par convergence, mais à un état ancestral de l'ancêtre commun des eucaryotes. L'absence de ces gènes chez certaines lignées unicellulaires résulterait donc de pertes indépendantes (Figure 33A) (Derelle et al., 2007). Des analyses phylogénétiques mettent également en évidence la subdivision des gènes à homéodomaine en deux groupes : les gènes TALE (qui présentent une insertion de trois acides aminés dans leur homéodomaine) et les gènes non-TALE (Figure 33B), tous deux étant supposés avoir déjà été présents chez l'ancêtre commun des eucaryotes (Banerjee-Basu et Baxevanis, 2001 ; Derelle *et al.*, 2007 ; Larroux *et al.*, 2008).

Les génomes de métazoaires contiennent des douzaines de gènes à homéodomaine: 130 chez l'anémone *Nematostella vectensis*, 97 chez la drosophile *Drosophila melanogaster* et 228 chez l'homme *Homo sapiens* (Nam et Nei, 2005 ; Ryan *et al.*, 2006). Ils sont distribués en sept classes (ANTP, PRD, POU, LIM, SIX, PAX and TALE) dont la plupart sont spécifiques aux animaux (Figure 34A). Parmi elles, la classe ANTP est de loin la plus diversifiée et est reconnue comme ayant joué un rôle majeur dans l'évolution des plans d'organisation des métazoaires, la mise en place des axes de symétrie et le développement du système nerveux, notamment (Garcia-Fernandez, 2005a ; Larroux *et al.*, 2008).

Les différentes familles de gènes de la super-classe ANTP sont classées en quatre sousclasses : Hox, Parahox, EHGbox et NKL (Pollard et Holland, 2000 ; Garcia-Fernandez, 2005b). Des membres de ces sous-classes ont été retrouvés dans les trois clades majeurs de bilatériens où ils possèdent souvent des fonctions conservées, l'exemple le plus connu étant celui des gènes *Hox* qui fournissent une information de position le long de l'axe antéropostérieur durant le développement (Garcia-Fernandez, 2005a, 2005b). L'étude de génomes de cnidaires et de placozoaire a révélé la présence de la quasi-totalité du répertoire de gènes des sous-classes NKL et EHGbox, mais un nombre de gène *Hox* plus restreint (Chourrout *et al.*, 2006 ; Kamm et Schierwater, 2006 ; Ryan *et al.*, 2006 ; Putnam *et al.*, 2007 ; Schierwater *et al.*, 2008). Les données de séquences et de localisation chromosomique des gènes indiquent

А	Trichoplax	Nematostella	Amphimedon
ANTP	14	78	8
NKL	NK2, NK5, NK6, Hex, Dlx, Dbx/Hlx+2 NK-related genes	all (bilaterian) families except Tlx	NK2(2/3), NK6, Msx, BarH-related, Hex-related, Tlx-related
Ext. Hox	Not, Mnx	all families except Eng and possibly Vax	-
Hox/ParaHox	Gsx+1 gene with some affinity to ext. Hox and Hox/ParaHox	Gsx, anterior Hox, posterior Hox/Cdx-like+several genes with unclear relation to bilaterian Hox/ParaHox genes	20 20
PRD	9 (Arx, Ebx/Arx-like, Pax3-like, PaxB, Prd/Pax-like, Pitx, Gsc, Otp)	33 (PaxA, B, C, Pax6-like, Arx, Rx, Pitx, Otx, Otp, Gsc & several unassigned)	9 (Arx, PaxB, Rx, OG12)
POU	2 (Pou3, 4,)	5 (POU1, 3, 4, 6)	4 (POU 1, 6, 2-5)
LIM-HD	5 (LIM1, 1/5, 3/4, 2/9, Isl)	6 (Lim1, 2, 3/4 Awh, Isl)	3 (LIM3, Lin-11, Isl)
SIX	2 (Six1/2, Six3/6)	5 (Six2, 3, 4, 4/5)	1 (Six1/2)
TALE	4 (PBX/PBC, Pknox, Irx, Meis)	7 (PBC, TGIF, Meis, Irx)	6 (Meis, PBC, Irx)
HNF	1	1	
Total	37	134	31



Divergence of sponge and eumetazoan lineages



Figure 34 : (A) La diversité des gènes à homéoboîte chez trois espèces de métazoaires basaux, *T. adherens, N. vectensis* et *A. queenslandica.* Les "-" indiquent l'absence de ces gènes (Schierwater *et al.*, 2008). (B) L'hypothèse du « protoNK » cluster (Larroux *et al.*, 2007). 6 familles de gènes à HD seraient apparues avant la divergence des éponges (LIM-HD, ANTP, Prd, Six and POU). Le gène ancestral de la sous-classe ANTP était de type NK. Des phénomènes de *cis*-duplication, ont donné lieu à un cluster « ProtoNK » de 5 ou 6 gènes que l'on retrouve chez *A. queenslandica.* L'expansion et la réorganisation de ce « ProtoNK » cluster a abouti à un cluster contenant tous les gènes NKL et au ProtoHox cluster.

ainsi que l'expansion de la super-classe ANTP s'est faite par des cis-duplications d'une région génomique unique avant la divergence entre les cnidaires/placozoaires et les bilatériens (Garcia-Fernandez, 2005a ; Kamm et Schierwater, 2006). L'analyse de ces génomes a apporté une quantité d'information sur l'évolution des gènes ANTP, sur leur regroupement en complexes de gènes et leurs lieux d'expression ou fonctions supposés. Cependant, la question de l'origine des gènes ANTP, et plus précisément des gènes Hox, restait ouverte (Garcia-Fernandez, 2005a). L'analyse du premier génome d'éponge (Amphimedon queenslandica) a permis de répondre partiellement à cette question cruciale. En effet, il apparaîtrait que les gènes Hox, Parahox et EGHbox ne seraient pas présents chez les éponges. Amphimedon queenslandica possède huit gènes ANTP, appartenant tous à la sous-classe NKL et, d'après les auteurs, l'ancêtre commun des métazoaires aurait possédé uniquement six à sept gènes ANTP (Figure 34B). Parmi eux, cinq formeraient un cluster « protoNK »: les gènes NK5-7, Tlx, Hex, Msx et NK2-4. L'origine du cluster protoHox serait donc postérieure à la divergence des éponges (Figure 34B) (Larroux et al., 2007). Ces résultats nécessitent cependant d'être pris avec certaines précautions. En effet, on ne peut réfuter la possibilité que des gènes (Hox ou autres) aient été perdus secondairement spécifiquement chez Amphimedon queenslandica, comme cela a déjà été montré pour d'autres gènes (Larroux et al., 2008) ou dans la lignée menant aux démosponges (Peterson et Sperling, 2007). Parallèlement, d'autres auteurs considèrent que les placozoaires représenteraient la lignée la plus basale. Dans cette hypothèse, l'ancêtre commun des métazoaires aurait possédé un répertoire ANTP plus diversifié que dans l'hypothèse du cluster « protoNK » avec notamment au moins un gène de type Hox, un de type NKL et un de type EGHbox (Schierwater et al., 2008).

Les études d'expression de gènes appartenant à la super-classe ANTP chez les éponges sont très restreintes. Le gène *EmH3* de la famille de gènes *Demox* (Richelle-Maurer *et al.*, 2006) est exprimé dans les archéocytes et pourrait être impliqué dans la différenciation cellulaire chez *Ephydatia* (Richelle-Maurer et Van de Vyver, 1999). Chez *Amphimedon queenslandica*, le gène *RenBsh* est exprimé dans les sclérocytes, suggérant un lien possible avec la spiculogenèse (Larroux *et al.*, 2006). Pour d'autres gènes du « protoNK » cluster (*NK2/3/4, Tlx, NK5/6/7*), les patrons sont bien moins clairs : ces gènes s'exprimeraient dans les micromères et/ou la masse cellulaire interne de la larve (Fahey *et al.*, 2008) (Figure 35 A et B). Ces données d'expression ont été obtenues uniquement chez des espèces de démosponges et principalement chez *Amphimedon queenslandica*. De plus, leurs interprétations



Figure 35 : (A) Exemples de patrons d'expression des gènes *NK* durant l'embryogénèse chez *A*. *queenslandica*. A à D : *AmqNK2/3/4* est exprimé dans des micromères. E à H : *AmqTlx* est exprimé dans la masse cellulaire interne et autour de l'anneau pigmenté. I à M : *AmqNK5/6/7* est exprimé dans quelques micromères et des macromères (Fahey *et al.*, 2008).

(B) Expression de *RenBsh* chez la larve *A. queenslandica* et plus précisément dans les sclérocytes (Larroux *et al.*, 2006).

fonctionnelles sont en général très limitées de part le fait que les expressions sont localisées dans des structures spécifiques au taxon des éponges et qu'aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée sur les éponges.

L'étude de ces gènes dans d'autres lignées d'éponges permettra sans doute d'apporter des informations supplémentaires nécessaires à la compréhension de l'origine de la super-classe ANTP et sur les fonctions ancestrales de ces gènes. C'est ce que nous avons entrepris de faire avec l'étude d'un gène *NK* (Gazave *et al.*, 2008) chez *Oscarella lobularis* (homoscléromorphe).

# B] Etude de l'expression d'un gène *NK* chez l'éponge *Oscarella lobularis*

### B.1 : Présentation de l'article

Suite à l'étude des gènes ANTP présents dans le génome de la démosponge *Amphimedon queenslandica*, Claire Larroux a proposé un scénario évolutif (hypothèse du cluster protoNK ) où l'ancêtre commun des métazoaires possédait uniquement six à sept gènes de type NK (Larroux et al., 2007). Nous avons décidé d'étudier des facteurs de transcription de la superclasse ANTP de type NK, dans une autre lignée afin de mieux appréhender la composition en gènes ANTP de l'ancêtre commun des métazoaires et également d'envisager la fonction de ces gènes.

donc entrepris une recherche de gènes NK chez des espèces Nous avons d'homoscléromorphes. Un gène NK a été obtenu par PCR chez cinq espèces différentes : Oscarella lobularis, Oscarella imperialis, Pseudocorticium jarrei, Plakina jani et Plakortis simplex. Les analyses phylogénétiques ont montré une affinité particulière, bien que non soutenue, de ces séquences (qui forment un clade nommé HomoNK) avec les familles NK6 et NK7 de gènes ANTP identifiés chez les eumétazoaires. De plus le cluster « protoNK », (l'hypothèse précédemment proposée par Larroux en 2007) qui serait composé des familles NK5-7, Tlx, Hex, Msx, NK2-4 et Bar/Bsh n'est pas retrouvé. L'identification de ce gène de la classe ANTP chez les homoscléromorphes et la topologie de la phylogénie permettent d'envisager plusieurs interprétations. Le clade HomoNK-NK6-NK7 peut représenter un groupe d'orthologie issu d'un gène ancestral unique présent chez l'ancêtre commun des métazoaires. Une duplication entre les NK6 et les NK7 serait ainsi postérieure à la divergence des éponges. Alternativement, on peut également envisager que le groupe HomoNK-NK6-NK7 ait été initialement présent chez l'ancêtre commun des métazoaires et que des pertes secondaires aient eu lieu dans certaines lignées d'éponges (et notamment A. queenlandica) et dans la lignée menant aux eumétazoaires.

La mise au point des techniques d'hybridation in situ (sur fragments d'individus entiers et sur coupes) sur notre modèle Oscarella lobularis a permis de tester l'expression de ce gène. Les résultats de ces expériences ont révélé un marquage spécifique dans les choanocytes, les cellules filtrantes des éponges. Les expressions chez Oscarella lobularis révèlent que ce gène (OlobNK) est un marqueur strict de la lignée choanocytaire. Chez les éponges, compte tenu de la croissance continue et de la (relative) mobilité cellulaire, les processus morphogénétiques ne sont pas restreints au développement embryonnaire ou à la reproduction asexuée, mais ont lieu tout au long de la vie de l'adulte. Des informations constantes de maintien des caractéristiques cytologiques et d'interactions cellulaires sont donc vraisemblablement nécessaires et OlobNK pourrait jouer un rôle dans de tels processus. Les ressemblances morphologiques entre choanocytes et certaines cellules sensorielles des Eumétazoaires ont récemment suscité un intérêt particulier. Il a été suggéré que les choanocytes puissent être les homologues des cellules sensorielles des eumétazoaires (Jacobs et al., 2007). Dans cette perspective audacieuse, il est intéressant de noter que les gènes de bilatériens des familles NK6 et NK7 (auquelles sont apparentés les HomoNK) sont exprimés de façon prépondérante dans des cellules neurales. Ce résultat appuie l'hypothèse stimulante que les cellules à collerette pourraient être homologues à toutes les cellules neurosensorielles des animaux.

Ce travail dont je suis 1<sup>er</sup> auteur a fait l'objet d'un article de recherches paru dans Development, Gene and Evolution en 2008.

# *B.2*: *Article* 5: NK homeobox genes with choanocyte-specific expression in homoscleromorph sponges.

**ORIGINAL ARTICLE** 

# NK homeobox genes with choanocyte-specific expression in homoscleromorph sponges

Eve Gazave · Pascal Lapébie · Emmanuelle Renard · Chantal Bézac · Nicole Boury-Esnault · Jean Vacelet · Thierry Pérez · Michaël Manuel · Carole Borchiellini

Received: 5 May 2008 / Accepted: 22 July 2008 / Published online: 14 August 2008 © Springer-Verlag 2008

Abstract Data on nonbilaterian animals (sponges, cnidarians, and ctenophores) have suggested that Antennapedia (ANTP) class homeobox genes played a crucial role in the early diversification of animal body plans. Estimates of ancestral gene diversity within this important class of developmental regulators have been mostly based on recent analyses of the complete genome of a demosponge species, leading to the proposal that all ANTP families found in nonsponges animals (eumetazoans) derived from an ancestral "proto-NK" six-gene cluster. However, a single sponge species cannot reveal ancestral metazoan traits, in particular because lineage-specific gene duplications or losses are likely to have occurred during the long history of the Porifera. We thus looked for ANTP genes by degenerate

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00427-008-0242-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Communicated by: M.Q. Martindale

E. Gazave · P. Lapébie · E. Renard · N. Boury-Esnault · J. Vacelet · T. Pérez · C. Borchiellini (⊠) Centre d'Océanologie de Marseille, Aix-Marseille Université, CNRS-UMR 6540, Station marine d'Endoume, rue de la batterie des Lions, 13007 Marseille, France e-mail: carole.borchiellini@univmed.fr

C. Bézac Centre d'Océanologie de Marseille, Aix-Marseille Université, CNRS-UMS 2196, Station marine d'Endoume, 13007 Marseille, France

M. Manuel Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR 7138 CNRS UPMC MNHN IRD, Case 05, 7 quai St Bernard, 75005 Paris, France polymerase chain reaction search in five species belonging to the Homoscleromorpha, a sponge lineage recently phylogenetically classified outside demosponges and characterized by unique histological features. We identified new genes of the ANTP class called HomoNK. Our phylogenetic analyses placed HomoNK (without significant support) close to the NK6 and NK7 families of enidarian and bilaterian ANTP genes and did not recover the monophyly of the proposed "proto-NK" cluster. Our expression analyses of the HomoNK gene OlobNK in adult Oscarella lobularis showed that this gene is a strict marker of choanocytes, the most typical sponge cell type characterized by an apical flagellum surrounded by a collar of microvilli. These results are discussed in the light of the predominant neurosensory expression of NK6 and NK7 genes in bilaterians and of the recent proposal that choanocytes could be the sponge homologs of sensory cells.

Keywords Porifera · Choanocyte · Homeobox · Cell differentiation · ANTP

#### Introduction

Because the sponges (Porifera) are widely accepted as one of the oldest metazoan lineages (Telford 2006; Nielsen 2008), the study of their developmental genes is expected to provide decisive clues on the evolutionary origin of fundamental processes acting in animal development. The sponge body plan, unique among animals, comprises a system of internal canals lined by pinacocytes (epitheliallike cells also covering the external parts of the sponge) and chambers lined by choanocytes, specialized filtering cells with apical flagellum surrounded by a collar of microvilli.

D Springer

Although their affinities with higher animals were once disputed, as they were considered at the "cellular grade" of body organization (Hyman 1940), the inclusion of sponges within monophyletic Metazoa has been supported by all recent molecular phylogenies (Dellaporta et al. 2006; Telford 2006; Dunn et al. 2008; Nielsen 2008). Unsettled issues include the monophyly vs. paraphyly of Porifera and the exact branching order between the major sponge lineages and the nonsponge (eumetazoan) taxa Ctenophora, Placozoa, Cnidaria, and Bilateria, for which phylogenies based on different molecular data sets have yet provided conflicting results (Borchiellini et al. 2001; Medina et al. 2001; Manuel et al. 2003; Nichols 2005; Dellaporta et al. 2006; Erpenbeck et al. 2007; Sperling et al. 2007; Wang and Lavrov 2007; Dunn et al. 2008).

Among the multitude of transcription factors acting during animal development, homeobox genes constitute an ancient family that dates back to the common ancestor of eukaryotes (Derelle and Manuel 2007; King et al. 2008; Larroux et al. 2008). Metazoan genomes contain several dozens of homeobox genes (e.g., 130 in the sea anemone Nematostella vectensis, 97 in the fruitfly Drosophila melanogaster, and 228 in human...) distributed in several major classes, most of which being animal specific (Garcia-Fernández 2005; Nam and Nei 2005; Ryan et al. 2006). Among them, the highly diversified Antennapedia (ANTP) class is thought to have played a critical role in the evolution of metazoan body plans (Larroux et al. 2008). The various families of ANTP genes, distributed into four subclasses (Hox, Parahox, EHGbox, and NKL; Larroux et al. 2007), are found in the three major clades of Bilateria (deuterostomes, lophotrochozoans, and ecdysozoans) and with a few exceptions, they are also present in cnidarian genomes (Chourrout et al. 2006; Kamm and Schierwater 2006; Ryan et al. 2006; Putnam et al. 2007). Thus, expansion of the ANTP class occurred before the divergence between cnidarians and bilaterians.

All previously characterized sponge ANTP homeobox genes belong to the NKL subclass (Larroux et al. 2007). Comparative studies on eumetazoan genomes have suggested that these NKL genes were ancestrally grouped in a cluster, and it has been proposed that this cluster was ancestrally expressed in the mesoderm (while the Hox cluster was linked to the ectoderm and the Para-Hox cluster to the endoderm; Garcia-Fernández 2005). However, this hypothesis has been criticized because *Tlx* ectodermal expression was evidenced in Ctenophora (Derelle and Manuel 2007).

In Cnidaria, the expression of several NKL genes has been characterized. For example, the *NK-2* gene acts in foot formation in *Hydra* (de Jong et al. 2006); the *Emx* gene is expressed in putative neurons (de Jong et al. 2006) and the *Msh/Msx* gene plays a role in transdifferentiation/regener-

#### D Springer

ation of striated muscle and mesoectodermal inductive interactions (Takahasi et al. 2008).

A comparison of NK-related genes present in the genome of the demosponge Amphimedon queenslandica with their orthologs in other metazoans, led Larroux et al. (2007) to propose that the last common ancestor of Metazoa probably possessed only six or seven NK-related genes (with reservation due to possible secondary loss in this species, see Peterson and Sperling 2007). Among them, at least five (NK5-7, Tlx, Hex, Msx, NK2-4) might have composed a hypothetic 'protoNK' cluster (Larroux et al. 2007). Remarkably, Hox, Parahox, and EHGbox homeobox genes are on the contrary absent from the Amphimedon genome (Larroux et al. 2007) suggesting that these genes have evolved after the sponges/Eumetazoa divergence or alternatively that they were present in a common metazoan ancestor but subsequently lost in the demosponge lineage (Peterson and Sperling 2007).

Expression and function data on sponge NKL genes are very scarce. The Demox family (Richelle-Maurer et al. 2006) gene *EmH3* in the freshwater sponge *Ephydatia* is expressed in archeocytes and may be implicated in this cell fate decision during differentiation (Richelle-Maurer and Van de Vyver 1999). The *BarBsh-Hb* gene in the demosponge *Halichondria* sp. is expressed during specific stages of the free-swimming larvae and also in adult cells during reaggregation (Hill et al. 2004). In the demosponge *A. queenslandica, RenBsh* gene expression in sclerocytes suggests a hypothetical link with spiculogenesis (Larroux et al. 2006). In general, functional interpretations of sponge expression patterns are limited.

We have undertook a search for NK homeobox genes in the Homoscleromorpha, a sponge lineage recently isolated from the demosponges based on molecular phylogenies (Borchiellini et al. 2004; Sperling et al. 2007). Homoscleromorpha could be the sister group of eumetazoans (Borchiellini et al. 2004; Sperling et al. 2007), although conflicting results have been obtained from other data sets (Wang and Lavrov 2007). Homoscleromorpha are uniquely distinguished from other sponge lineages (Hexactinellida, Calcispongia, Demospongiae s.s.) by their possession of eumetazoan-like true epithelia with type IV collagencontaining basement membranes and specialized cell junctions (Boute et al. 1996). In addition, unlike other sponges, their morphogenesis is epithelial (Gilbert 2006; Ereskovsky et al. 2007). Whatever the phylogenetic significance of these characters (Aouachaeria et al. 2006), homoscleromorphs are thus a particularly key sponge group for evo-devo studies. Most previous work on sponge developmental genes used demosponge species (Ephydatia freshwater demosponges and the marine species Suberites domuncula and A. queenslandica) but data stemming from only one sponge lineage cannot be representative of all sponges. As largely recognized, the multiplication of models in evo-devo is necessary, in particular to reconstruct primitive vs. derived character states among clades (Jenner and Wills 2007).

Here, we report the identification of new NK homeobox genes, with representatives sequenced from five homoscleromorph species. Phylogenetic analyses suggest an affinity with the NK6 and NK7 families of ANTP genes. The expression of this gene was analyzed in the homoscleromorph *Oscarella lobularis* and found to be restricted to one cell type, the choanocytes. The evolutionary implications of these data are discussed and compared with expression data from NK6 and NK7 genes in bilaterians.

#### Materials and methods

#### Sampling

For molecular experiments, specimens of five homoscleromorph species from four different genera (*O. lobularis* (Schmidt 1862), *O. imperialis* Muricy, Boury-Esnault, Bézac, and Vacelet, 1998, *Pseudocorticium jarrei* Boury-Esnault, Muricy, Gallissian and Vacelet, 1995, *Plakina jani* Muricy, Boury-Esnault, Bézac, and Vacelet, 1995, and *Plakortis simplex* Schulze 1880) were collected in the northwestern Mediterranean Sea (Table 1). Samples were carefully cleaned after collection to remove potential epibionts and cut into slices. Before mRNA extraction, tissue samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For in situ hybridization (ISH) experiments, specimens of *O. lobularis* were collected during summer in 2005 and 2006, at two different locations in NW Mediterranean Sea (Table 1), at different life cycle periods.

#### mRNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from tissues of each species. mRNA extractions were performed using the QuickPrep Micro mRNA Purification Kit according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences). In order to avoid RNase activities, all products were treated with diethylpyrocarbonate (DEPC). First strand cDNA was synthesized using the First Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Biosciences), according to the protocol provided, with an oligo (dT)-(adapter)-primer and total m RNA. The reaction provided RNA-cDNA heteroduplexes conserved at -80°C.

PCR conditions and primers

Different sets of degenerate primers were used to amplify homeobox gene fragments from cDNA. Primers pairs and polymerase chain reaction (PCR) product sizes for each species are given in Table 1 (for primer sequences, see supplementary material S1). Nested PCR were performed under the following regime: denaturation at 94°C for 1 min, primer annealing for 1 min (annealing temperature depending on the primer set), and extension for 2 min at 72°C, with 35 cycles. Five microliters of the first amplification was used as a template for the nested PCR.

#### Cloning and sequencing of PCR products

Prior to cloning, all amplified PCR products were isolated from agarose gels according to the manufacturer's instructions for the kits used: either Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) or the Montage Gel Extraction Kit (Millipore). Purified PCR fragments were cloned into pGEM-T Easy Vector System I (Promega). Plasmid DNA from transformed *Escherichia coli* (thermocompetent DH5- $\alpha$  stem) cells was recovered using Wizard+SV Miniprep (Promega) and sequenced by MWG Biotech. The resulting sequences were deposited in the GenBank database and their respective accession numbers are listed in Table 1.

#### Sequence analyses

Preliminary Blastx searches (Altschul et al. 1997; National Center for Biotechnology Information) against public databases revealed high similarity of the recovered Homoscleromorpha partial sequences with homeodomains of the ANTP class. We thus constructed a data set including the homeodomain of ANTP families NK1 to NK-7, Tlx, Hex,

Table 1 Homoscleromorph species, from NW Mediterranean Sea used in this work

Species	Collecting sites	Primers used	Size of the PCR product	Sequence name	Accession numbers
Oscarella lobularis	Grotte à Corail Caramasseigne	MoxS1/Hox3 Hox1/Hox3	81 pb	OlobNK	EF434865
Oscarella imperialis	Archipel Riou	MoxS1/MoxR1 Mox S1/Hox3	117 pb	OimpNK	EF434867
Plakortis simplex	Grotte des 3PP	MoxS1/MoxR1 Mox S1/Hox3	117 pb	PlsimNK	EF434869
Pseudocorticium jarrei	Grotte de Jarre	MoxS1/MoxR1 Mox S1/Hox3	117 pb	PsjarNK	EF434866
Plakina jani	Grotte des 3PP	MoxS1/MoxR1 Mox S1/Hox3	117 pb	PjanNK	EF434868

Primer used, size of PCR products (excluding primers), sequence names, and accession numbers are mentioned.

#### D Springer

Msx, Bar, Bsh, Dlx, Lbx, Dbx, Hlx, Gbx, Emx, EmH, Mox, and Hox, by selecting at least one representative from protostomes, deuterostomes, Cnidaria, and Porifera (when available) and using *Pax* genes as outgroup. We chose the *NK* gene nomenclature proposed by Larroux et al. (2007). The resulting data set was aligned with Clustal W and subsequently corrected by eye in Bioedit Sequence Alignement Editor 5.09 (Hall 1999; alignment given in supplementary material S2). There were no gaps in the sequences but some sequences were incomplete; lacking positions were scored as missing data. The homeodomain sequences used for phylogenetic analyses are listed with their accession numbers in supplementary material S3.

For phylogenetic analyses, we employed three different methods. Neighbor-joining (NJ) distance analyses were performed with uncorrected distances (software Paup 4.0b10, Swofford 2000). Maximum likelihood (ML) analysis was performed on the PhyML website (http://atgc. limm.fr/phyml; Guindon and Gascuel 2003). The selected model of amino acid substitutions was WAG (Wheland and Goldman 2001) and among site rate variation was estimated using a discrete approximation to the gamma distribution with four rate categories. Parameters (proportion of invariant sites and gamma shape parameters) were estimated during the search. Node robustness was tested by bootstrap analysis (Felsenstein 1985) with 1,000 replicates. Bayesian analysis was performed with MrBayes 3.1, using WAG fixed model (Huelsenbeck and Ronquist 2001). Two sets of six independent simultaneous metropolis-couples Markov chains Monte Carlo were run for ten million generations and sampled every hundredth generation. The runs were monitored for convergence and an adequate burn-in was removed (above 25% of tree and parameters). Bayesian posterior probabilities (PP) were used for assessing the confidence value of each node (Huelsenbeck et al. 2001).

#### 3' RACE PCR

The 81-bp (without primers) *O. lobularis* homeobox gene fragment obtained after nested PCR was extended using 3' RACE-PCR to reach a sequence length appropriate for RNA antisense probe synthesis. Two specific primers were designed: Race 3-1, as first forward primer, and Race 3-2, as second nested forward primer. The reverse primer used was *Not*-I(dT)<sub>18</sub>, provided with the First Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Biosciences; for primer sequences, see supplementary material S1). A first RACE PCR was performed using the couple Race 3-1/*Not*-I(dT)<sub>18</sub>, followed by nested RACE PCR with Race 3-2/*Not*-I(dT)<sub>18</sub>. The PCR reaction was performed in *Taq* DNA polymerase buffer 1X; MgCl2 2  $\mu$ M; dNTP mix 0,1 mM; Taq polymerase (Promega) 1 unit; forward primer (3-1 or 3-2) 1.5  $\mu$ M; oligo *Not*-I(dT)<sub>18</sub> 1.5  $\mu$ M; sterile H<sub>2</sub>O qsp 25  $\mu$ I. A hot start

#### D Springer

was performed in order to avoid nonspecific amplifications. For first RACE PCR, 40 cycles were performed (95°C, 30s; 55°C, 30s; 72°C, 2 min) followed by a final elongation step at 72°C for 10 min. Nested RACE reactions were performed using 1  $\mu$ l of the first RACE reactions as template. The PCR program was identical to first RACE, except that the annealing temperature was increased to 60°C and 30 cycles (instead of 40) were performed. PCR products were cloned and sequenced as previously indicated.

#### In situ hybridization

ISH were performed on whole mounted lobes (whole mount in situ hybridization, WMISH) and on serial sections of adult tissues, two complementary approaches for visualizing all structures and cell types. Moreover, embryos are observable on sections, when present in the mesohyl.

RNA probes were synthesized with the digoxygenin (DIG) RNA Labelling Kit (SP6/T7; Roche). Antisense and sense (for use as a negative control) *OlobNK* probes (546 bp) were synthesized. In addition, actin antisense probe (893 bp) used as a positive control was transcribed from a clone of *O. lobularis* after identification in an unpublished EST set. After cleaning, samples were fixed in 4% paraformaldehyde in seawater during 12 h at 4°C and transferred into in 100% methanol for conservation at  $-20^{\circ}$ C.

ISH protocols were adapted from Martinez et al. (1997). For histological sectioning, samples were embedded in paraffin and cut into 10-µm-thick sections with a microtome. Sections were dewaxed in a xylene substitute (LMR, sodipro) and all samples of tissues (for WMISH) and sections were rehydrated in phosphate buffered saline (PBS)/ethanol with decreasing ethanol concentrations.

For WMISH, the proteinase K was used for permeabilizing samples during 20 min at room temperature, for sections, a RIPA solution was preferred during 10 min also at room temperature. RIPA solution was composed of: 0.016 M NaCl; 0.02 M Tris base;  $10^{-3}$  M ethylenediaminetetraacetic acid; 0.1% sodium dodecyl sulfate; 0.001%Igepal; 0.5% Na-deoxycholate. The proteinase K reaction was stopped by glycine (40 mg/ml) and samples (WMISH) were washed three times in PBS with Tween (PBT; PBS and 0.1% Tween 20).

Samples (WMISH) and histological sections were postfixed with 4% paraformaldehyde and acetylated by incubation in 0.25% anhydride acetic solution in 0.1 M to limit nonspecific probe hybridization. After washing at least three times in PBT, prehybridizations of samples (WMISH) and sections were performed in sodium chloride/sodium citrate (SSC) 2X, supplemented with 50% deionized formamide at 58°C during 90 min. Then, samples and sections were incubated in hybridization solution with a DIG-labeled probe [1  $\mu$ g/ml]. Hybridization proceeded during 48 h at 58°C. Hybridization solution contained 50% deionized formamide; 5X SSC; tRNA; CHAP 0.1%; 1X Denhardt solution; heparin 50 µg/ml; 0.1% Tween 20; and 10% DEPC water. Subsequently, samples were washed at 58°C, three times for 10 min in hybridization solution 100%, and then one time in hybridization solution 75%/SSC 2X 25%, hybridization solution 50%/SSC 2X 50%, and hybridization solution 25%/SSC 2X 75%. A 30-min wash was then performed in SSC 2X, CHAP 0.1% solution. Sections were washed in 50% SSC 2X, and once for 30 min in maleïc acid buffer with 0.1% Tween 20 (MABT).

After blocking (1X blocking reagent for nucleic acid [Roche] in MAB) for 30 min (sections) or 90 min (WMISH), samples were incubated in anti-DIG antibody conjugated to alkaline phosphatase (dilution 1:1,000) overnight, in a humid chamber, at 16°C. Sections were washed (four times for 15 min) in MAB solution and 30 min in 0.1 M NaCl, 0.1 M Tris pH 9.5, 0.1% Tween 20 (NTT) and samples were washed (6×1 h) in MAB at room temperature before a last wash at 4°C overnight. Then, samples were washed in MAB (10 min) and NTT (3×15 min). Staining was revealed with the phosphatase alkaline substrate BM purple (Roche ®) in the dark overnight. After washing 5 min in PBS, sections were covered with a cover slide and analyzed under a light microscope and samples under a binocular magnifier. Pictures were taken with a camera Evolution LC color (Mediacybernetics ®).

#### Results

#### Sequences and phylogenetic analyses of homeodomains

Five partial homeobox gene fragments were isolated from five homoscleromorph species (*O. lobularis*, *O. imperialis*, *Pseudocorticium jarrei*, *Plakina jani*, and *Plakortis simplex*). Highly similar sequences were obtained from these different species collected from various localities and environments. This strong affinity is shown by the high percentage of similarity (88.9% to 100%) shared by these five sequences (Fig. 1), excluding contamination by foreign organisms, a possibility that has to be checked systematically with sponges because of the presence of numerous epi- and/or endosymbionts. Results of Blastx searches indicated weak similarity to NK6 and NK7 genes (*e*-values from  $1e^{10-5}$  to  $5e^{10-9}$ ); thus, these different sequences have been named: *OlobNK*, *OimpNK*, *PjanNK*, *PsjarNK*, and *PlsimNK*.

Phylogenetic analyses were performed using the NJ, ML, and Bayesian methods. The five new sequences form a strongly supported clade with all methods (88% in ML, 98% in NJ, and pp=1 in Bayesian; Fig. 2). Significantly, these sequences do not show any strong affinity with previously reported homeodomain sequences from sponges. The NK homoscleromorph sequences form a clade together with the NK7 and NK6 families and the *AmqNK567* gene from the demosponge *A. queenslandica*, but this relationship is not supported by bootstrap indices. Two extremely divergent sequences from *A. queenslandica* previously reported as *NK5/6/7*-related genes, included in preliminary analyses, were subsequently excluded because their long branches strongly destabilized the topology.

A detailed analysis of residues at specific positions in the homeodomain sequence provide some support for this clade-grouping Homoscleromorph *NK* genes with eumetazoan *NK7*, *NK6*, and demosponge *AmqNK5/6/7* (see supplementary material S2). A glycine at the tenth position is exclusively shared between all members of this clade (Homoscleromorph *NK* genes, NK7, and NK6 families and *AmqNK5/6/7*), excepted for one species *Pseudocorticium jarrei*. An arginin at the 11th position is not only shared between Homoscleromorph sequences and the NK7 family but also by the sequence *NvLbx*.

Our present phylogenetic analyses on a larger set of ANTP genes than previously done by Larroux et al. (2007) do not support the clade named 'Proto-NK cluster' by these authors, comprised of NK5–7, Tlx, Hex, Msx, NK2–4, and Bar/Bsh families. The NK2, NK3, and NK4 families constitute a clade as in Larroux et al. (2007), but in contradiction with the later study, the NK5 family does not group with the NK6 and NK7 families.



Fig. 1 Alignment of Homoscleromorpha homeodomain fragments. The lacking positions of the homeodomain sequence are indicated by *dashes*; positions are annotated from position 1 to 60 of the

homeodomain sequence. Conserved positions are shaded in *dark* gray; variable positions showing similar residues are shaded in *clear* gray

#### D Springer





◄ Fig. 2 Phylogramm in maximum likelihood, with ANTP families' representatives and the five new sequences of homoscleromorph species. Sponge sequences are written in *red*, enidarian sequences in *blue*, and bilaterian sequences in *black*. Bootstrap values greater than 50% are indicated (500 in NJ and ML) *above* (ML) and *below* (NJ) the branches. An *asterisk* indicates a Bayesian posterior probability greater than or equal to 95%. *Pax* 7 sequences are used as outgroups

In situ hybridization analysis

A *OlobNK* DIG-labeled RNA probe was used to determine the expression pattern of this gene in *O. lobularis*. Results from whole mount in situ hybridizations and from histological serial sections were congruent. Choanocytes were brightly stained, whereas pinacocytes, apopylar cells, and mesohyl cells were not stained (Fig. 3a,d–g). The

Fig. 3 In situ hybridization pattern in O. lobularis. a The expression pattern of OlobNK, on whole mount, shows that choanocyte chambers are stained. b Actin positive control on whole mount, all the tissues are stained. c Negative control on whole mount, without probe, no staining. d Expression pattern of OlobNK observed on sections at low magnification, only choanocyte chambers (C. Ch) are stained, nonreproductive specimen. e Expression pattern of OlobNK observed on sections at high magnification, only the choanocytes are stained, nonreproductive specimen. f Expression pattern of OlobNK observed on section from a specimen in reproduction. Embryos (Em) and prelarvae (PLa) are not stained in contrast to choanocyte chambers (C.Ch). g Expression pattern of OlobNK observed on section from a specimen in spermatogenesis. Spermatocytes (Sp) are not stained in contrast to choanocyte chambers (C.Ch). h Expression pattern of actin positive control on section from a specimen in reproduction. Cells and embryos are stained. i Negative control (without probe) on section from a specimen in reproduction. No staining. C.Ch Choanocyte chamber, C choanocyte, Ca canal, Me mesohyl, Em embryo, PLa prelarvae, Sp spermatocyte, Pi pinacocyte



D Springer

choanocytes showed variable staining intensity. This could be an optical effect, an artifact due to the sensitivity of the ISH technique, or, alternatively, it may reflect true variation of expression levels between choanocytes. In contrast, with the actin antisense probe, we obtained staining of all cell categories (Fig. 3b,h). The *OlobNK* and actin sense probes gave no staining. Altogether, these results suggest that the staining in choanocytes with the *OlobNK* antisense probe is specific. In reproducing specimens, expression of *OlobNK* also appeared to be restricted to choanocytes, whereas oocytes, spermatocytes, embryos, or prelarvae were not stained (Fig. 3f,g), suggesting that *OlobNK* is weakly or not expressed in these various reproductive stages.

#### Discussion

ANTP class genes identified from homoscleromorph sponges

Our degenerate PCR searches recovered NK-related homeobox genes from the homoscleromorph sponge lineage. We propose to call these new genes HomoNK. HomoNK sequences isolated from the five investigated homoscleromorph genera are highly similar and clearly form a clade within the ANTP class tree (Fig. 2)

Although the HomoNK common branch is not particularly long (Fig. 2), the precise affinities among the ANTP class are unclear. *HomoNK* genes are not closely related to any NK family previously identified from calcareous sponges (Manuel and Le Parco 2000) or demosponges (Richelle-Maurer and Van de Vyver 1999; Hill et al. 2004; Richelle-Maurer et al. 2006; Larroux et al. 2006, 2007), in particular from the fully sequenced genome of *A. queenslandica* (Larroux et al. 2007). This observation suggests that the homoscleromorph ANTP class gene complement is divergent from that of demosponges, in consistence with the hypothesis that Homoscleromorpha constitute a lineage distinct from Demospongiae (Borchiellini et al. 2004; Sperling et al. 2007).

However, it should be reminded that analyses of homeodomains at these large phylogenetic scales suffer from an inherent limitation, due to the small number of available characters (60 aa). In our analyzed data set, 51 positions are informative. In addition, the new HomoNK sequences are partial, which potentially represents a further limitation for their exact phylogenetic placement, although in our experience, the homeodomain region that we recovered here from our PCR searches is generally sufficient for unambiguous identification of known families among the ANTP class. Accordingly, in our analysis (Fig. 2), known gene families are robustly recovered (e.g., Msx, Dll, Hlx, Dlx ...), but on the contrary, their relationships are poorly resolved as observed

#### D Springer

in all previous phylogenetic studies of homeodomains (e.g., Hill et al. 2004; Kamm and Schierwater 2006; Larroux et al. 2006; Richelle-Maurer et al. 2006; Derelle and Manuel 2007; Larroux et al. 2007). It is worth noting in particular that the 'protoNK cluster' as defined by Larroux et al. (2007) is not recovered here, thus casting doubts on the scenario of ANTP gene evolution proposed in the later study.

In our tree, the HomoNK group forms an unsupported clade with the NK6 and NK7 families from enidarians and bilaterians and with the AmqNK567 gene from A. queenslandica (Fig. 2). These relationships are also supported by the exclusive sharing of a few particular residues within the HD sequence, between HomoNK and NK6 and/or NK7 genes (see "Results"). If the observed topology truly reflects the gene genealogy, several interpretations are possible. The HomoNK-NK6-NK7 clade may represent an ancient orthology group that was represented by a unique gene in the common ancestor of Metazoa. The duplication between NK6 and NK7 would be posterior to the divergence between sponges and eumetazoans. A corollary of this scenario is that the position of AmqNK567, sister group of the NK6 family in Fig. 2, is artifactual and due to the long branch of this demosponge gene. However, sponges may not necessarily have retained ancestral character states (see Peterson and Sperling 2007), and an alternative scenario is equally likely, in which the HomoNK-NK6-NK7 group would have been already diversified in the common metazoan ancestor, into three to four different genes. Then, NK6 and NK7 members would have been lost in sponges lineages, while eumetazoans would have lost their orthologs of the HomoNK and AmqNK567 genes.

In conclusion, the relationships of the new genes identified from homoscleromorphs are ambiguous, but our finding increases the gene diversity among the ANTP class with respect to previous estimates from demosponge, enidarian, and bilaterian genomes. Significantly, the present study confirms that the genome of a single demosponge species (*A. queenslandica*) cannot be taken as representative of the situation in the last common ancestor of Metazoa (Peterson and Sperling 2007; Nielsen 2008).

# The OlobNK gene is a marker of choanocytes in *O. lobularis*

The choanocyte, a specialized pumping and filtering flagellated cell with apical collar of microvilli, is the most characteristic cell type of the sponge body plan. Our ISH analysis of the *OlobNK* gene, in whole mount specimens and tissue sections of the homoscleromorph *O. lobularis* (containing gametes and various developmental stages), revealed exclusive expression in the choanocytes. On the contrary, we failed to detect expression in other cell types

of the adult sponge, as well as in the germ line and in embryos and prelarvae. To date, the only example of a choanocyte-specific gene was *Annexin* in the demosponge *Ephydatia fluviatilis* (Fuanayama et al. 2005). Other examples of cell-type specific genes previously isolated from sponges include *Emh3* gene in *Ephydatia* archeocytes and *RenBsh* in *Amphimedon* sclerocytes (Richelle-Maurer and Van de Vyver 1999; Larroux et al. 2006).

The fact that OlobNK is an exclusive marker of choanocytes is supported by the lack of expression in spermatogonies. Many sponge cells have the capacity to transdifferentiate (i.e., to change their phenotype from one differentiated cell type to another; Gaino et al. 1995). Choanocytes are among the cells that are able to follow this process. In particular, in homoscleromorph sponges, the male germ line clearly derives from choanocytes (Boury-Esnault and Jamieson 1999). Male sperm cysts that are easily identified on Oscarella tissue sections did not express the OlobNK gene, implying that gene expression stops during this transformation. This restriction of expression in a single cell type of the adult sponge, with no expression during gametogenesis or embryonic development, is remarkable because most developmental genes in nonsponge animals are characterized by pleiotropy and multiple expression territories during the life cycle (Gilbert 2006).

In sponges, morphogenetic processes are not restricted to embryonic development, asexual reproduction, and growth, but they are acting throughout life in the adult, because cells are in constant movements and reorganization (Richelle-Maurer and Van de Vyver 1999). However, morphological structures such as the aquiferous system canals and the choanocyte chambers are relatively stable. Thus, constant information is probably required to maintain the cytological characteristics of the various cell types and the cell-cell interactions responsible for the global organization of adult sponge tissues. The exclusive expression of the homeobox transcription factor OlobNK in the choanocyte chambers suggests that it could play a role in such processes. Therefore, by comparison with known functions of homeobox genes in bilaterian and cnidarian models (Hwang et al. 2007), plausible functions for OlobNK include the maintenance of choanocyte cell identity, through the control of target genes responsible for the choanocyte phenotype and function. Alternatively, OlobNK could provide an information of position (possibly downstream of an extracellular signaling system), responsible for example for the maintenance of the distribution and organization of choanocyte chambers.

In addition to being central in the biology of sponges, choanocytes have recently attracted special attention as the possible sponge homologs of the eumetazoan sensory cells (Jacobs et al. 2007; Nielsen 2008). Choanocytes, with their apical flagellum surrounded by a collar of microvilli, bear striking ultrastructural similarities with eumetazoan sensory cells such as mecanoreceptors (Jacobs et al. 2007). In contrast with the rational assumption that sensory cells originated once in a common ancestor of all nonsponge animals (Eumetazoa), the sponges exhibit responses to sensory stimuli and possess genes employed in the development of sense organs (Jager et al. 2006; Leys and Meech 2006; Jacobs et al. 2007). There is indirect evidence that choanocyte chambers could be responsible for these sensory-like perceptions in sponges, thus possibly representing a sponge structure homolog to eumetazoan sense organs (Jacobs et al. 2007). In addition, the choanocyte cell is highly similar, structurally and functionally, to the choanoflagellates, the unicellular sister group of Metazoa (Nielsen 2001; Maldonado 2004), leading authors to propose that the choanoflagellates (and by extension, the choanocyte) would be the universal common ancestral sensor from which all metazoan sensory cells derived (Fritzsch et al. 2006).

Because eumetazoan sensory and nerve cells are clearly related (to the extent that in enidarians they cannot be clearly separated into two distinct categories (Grimmelikhuijzen and Westfall 1995)), the choanocytes may be, by extension, homologous to all neurosensory cells found in nonsponge animals. Interestingly, bilaterian homeobox genes of the NK6 and NK7 families, the closest relatives of HomoNK in our tree (Fig. 2), have a predominantly neural expression. The NK6 genes have central roles in the patterning of the central nervous system in vertebrates, insects, and tunicates (Uhler et al. 2002; Alanentalo et al. 2006; Zhao et al. 2007). Few data are available for the NK7 family, but in Drosophila, the NK7 ortholog is expressed in the labral sensory complex (in addition to its expression in the proventriculus, a region of the embryonic gut, see http:// www.fruitfly.org/cgi-bin/ex/bquery.pl?qtype=report& find=CG8524&searchfield=CG). We do not intend to emphasize the evolutionary significance of this parallel between bilaterian NK6-NK7 expression in developing neurosensory structures and HomoNK expression in the sponge choanocytes, because orthologies are not supported and because comparisons based on a single gene are hazardous. Rather, this observation should be taken as stimulative for future investigation of bilaterian neural genes homologs in sponges, in order to test the hypothesis of homology between choanocytes and neurosensory cells.

D Springer

Acknowledgments We thank to the diving staff of the COM (Roland Graille, Frederic Zuberer, and Bernard De Ligondes) and Christophe Lejeusne for their help in sampling. We also thank Alexander Ereskovsky for helpful comments, Christian Marschal for his help in the use of the microscope and binocular magnifier and also Dr Clive Wilkinson and Michael Paul for help with the English revision.

#### References

- Alanentalo T, Chatonnet F, Karlen M, Sulniute R, Ericson J, Andersson E, Ahlgren U (2006) Cloning and analysis of Nkx6.3 during CNS and gastrointestinal development. Gene Expr Patterns 6:162–170
- Atschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25:3389–3402
- Aouachaeria A, Geourjon C, Aghajari N, Navratil V, Deléage G, Lethias C, Exposito JY (2006) Insights into early extracellular matrix evolution: Spongin short chain collagen-related proteins are homologous to basement membrane type IV collagens and form a novel family widely distributed in invertebrates. Mol Biol Evol 23:2288–2302
- Borchiellini C, Manuel M, Alivon E, Boury-Esnault N, Vacelet J, Le Parco Y (2001) Sponge paraphyly and the origin of Metazoa. J Evol Biol 14:171–179
- Borchiellini C, Chombard C, Manuel M, Alivon E, Vacelet J, Boury-Esnault N (2004) Molecular phylogeny of Demospongiae: implications for classification and scenarios of character evolution. Mol Phyl Evol 32:823–837
- Boury-Esnault N, Jamieson BGM (1999) Porifera. In: Jamieson PGM (ed) Progress in male gamete ultrastructure and phylogeny. Wiley, Chichester, NY, pp 1–20
- Boute N, Exposito JY, Boury-Esnault N, Vacelet J, Noro N, Miyazaki K, Yoshigato K, Garrone R (1996) Type IV collagen in sponges, the missing link in basement membrane ubiquity. Biol Cell 88:37–44
- Chourrout D, Delsuc F, Chourrout P, Edvardsen RB, Rentzsch F, Renfer E, Jensen MF, Zhu B, de Jong P, Steele RE, Technau U (2006) Minimal ProtoHox cluster inferred from bilaterians and cnidarian Hox complements. Nature 442:684–687
- Dellaporta SL, Xu A, Sagasser S, Jakob W, Moreno MA, Buss LW (2006) Mitochondrial genome of *Trichoplax adhaerens* supports Placozoa as the basal lower metazoan phylum. Proc Natl Acad Sci U S A 103:8751–8756
- de Jong DM, Hislop NR, Hayward DC, Reece-Hoyes JS, Pontynen PC, Ball EE, Miller DJ (2006) Components of both major axial patterning systems of the Bilateria are differentially expressed along the primary axis of a 'radiate' animal, the anthozoan cnidarian Acropora millepora. Dev Biol 298:632–643
- Derelle R, Manuel M (2007) Ancient connection between NKL genes and the mesoderm? Insights from *Tlx* expression in a ctenophore. Dev Genes Evol 214:253–261
- Dunn CW, Hejnol A, Matus DQ, Pang K, Browne WE, Smith SA, Seaver E, Rouse GW, Obst M, Edgecombe GD, Sorensen 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
- Ereskovsky AV, Tokina DB, Bézac C, Boury-Esnault N (2007) Metamorphosis of cinctoblastula larvae (Homoscleromorpha, Porifera). J Morphol 268:518–528
- Erpenbeck D, Voigt O, Adamski M, Adamska M, Hooper JN, Worheide G, Degnan BM (2007) Mitochondrial diversity of early-branching metazoa is revealed by the complete mt genome of a haplosclerid demosponge. Mol Biol Evol 24:19–22
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783–791
- Funayama N, Nakatsukasa M, Hayashi T, Agat K (2005) Isolation of the choanocyte in the fresh water sponge, *Ephydatia fluviatilis* and its lineage marker, *Ef annexin*. Dev Growth Differ 47:243–253
- Fritzsch B, Beisel KW, Hansen LA (2006) The molecular basis of neurosensory cell formation in ear development: a blueprint for

D Springer

hair cell and sensory neuron regeneration, Bioessays 28:1181-1193

- Gaino E, Manconi R, Pronzato R (1995) Organizational plasticity as a successful conservative tactics in sponges. Anim Biol 4:31–43
- Garcia-Fernàndez J (2005) The genesis and evolution of homeobox gene clusters. Nat Rev Genet 6:881–892
- Gilbert S (2006) Developmental biology, 8th edn. Sinauer, Sunderland, MA
- Grimmelikhuijzen CJP, Westfall JA (1995) The nervous systems of cnidarians. In: Breidbach O, Kutsch W (eds) The nervous systems of invertebrates: an evolutionary and comparative approach. Birkhäuser, Basel, Switzerland, pp 7–24
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol 52:696–704
- Hall TA (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser 41:95–98
- Hill A, Tetrault J, Hill M (2004) Isolation and expression analysis of a poriferan Antp-class Bar-/Bsh-like homeobox gene. Dev Genes Evol 214:515–523
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17:754–755
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, Bollback JP (2001) Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. Science 294:2310–2314
- Hwang JS, Ohyanagi H, Hayakawa S, Osato N, Nishimiya-Fujisawa C, Ikeo K, David CN, Fujisawa T, Gojobori T (2007) The evolutionary emergence of cell type-specific genes inferred from the gene expression analysis of *Hydra*. Proc Natl Acad Sci U S A 104:14735–14740
- Hyman LH (1940) The invertebrates, vol 1. Protozoa through Ctenophora. McGraw-Hill Book, New York and London
- Jacobs DK, Nakanishi N, Yuan D, Camara A, Nichols SA, Hartenstein V (2007) Evolution of sensory structures in basal metazoa. Integr Comp Biol 47:712–723
- Jager M, Quéinnec E, Houlison E, Manuel M (2006) Expansion of the SOX family predated the emergence of the Bilateria. Mol Phyl Evol 39:468–477
- Jenner RA, Wills MA (2007) The choice of model organisms in evodevo. Nat Rev 8:311–318
- Kamm K, Schierwater B (2006) Ancient complexity of the non-hox ANTP gene complement in the Anthozoan Nematostella vectensis. Implications for the evolution of the ANTP superclass. J Exp Zool (Mol Dev Evol) 306B:589–596
- King N, Westbrook MJ, Young SL, Kuo A, Abedin M, Chapman J, Fairclough S, Hellsten U, Isogai Y, Letunic I, Marr M, Pincus D, Putnam N, Rokas A, Wright KJ, Zuzow R, Dirks W, Good M, Goodstein D, Lemons D, Li W, Lyons JB, Morris A, Nichols S, Richter DJ, Salamov A, Sequencing JGI, Bork P, Lim WA, Manning G, Miller WT, McGinnis W, Shapiro H, Tjian R, Grigoriev IV, Rokhsar D (2008) The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. Nature 451:783–788
- Larroux C, Fahey B, Liubicich D, Hinman VF, Gauthier M, Gongora M, Green K, Wörheide G, Leys SP, Degnan BM (2006) Developmental expression of transcription factor genes in a demosponge: insights into the origin of metazoan multicellularity. Evol Dev 8:150–173
- Larroux C, Fahey B, Degnan SM, Adamski M, Rokhsar DS, Degnan BM (2007) The NK homeobox gene cluster predates the origin of Hox genes. Curr Biol 17:1–5
- 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(5):980–996
- Leys SP, Meech RW (2006) Physiology of coordination in sponges. Can J Zool 84:288–306

- Maldonaldo M (2004) Choanoflagellates, choanocytes, and animal multicellularity. Invert Biol 123:1-22
- Manuel M, Le Parco Y (2000) Homeobox gene diversification in the calcareous sponge Sycon raphanus. Mol Phyl Evol 17:97–107
- Manuel M, Borchiellini C, Alivon E, Le Parco Y, Vacelet J, Boury-Esnault N (2003) Phylogeny and evolution of calcareous sponges: monophyly of Calcinea and Calcaronea, high level of morphological homoplasy, and the primitive nature of axial symmetry. Syst Biol 52:311–333
- Martinez DE, Dirksen M-L, Bode PM, Jamrich M, Steele RE, Bode HR (1997) Budhead, a fork head/HNF-3 homologue, is expressed during axis formation and head specification in Hydra. Dev Biol 192:523–536
- 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 Natl Acad Sci U S A 98:9707–9712
- Murtha MT, Leckman JF, Ruddle FH (1991) Detection of homeobox genes in development and evolution. Proc Natl Acad Sci U S A 88:10711–10715
- Nam J, Nei M (2005) Evolutionary change of the numbers of homeobox genes in bilateral animals. Mol Biol Evol 22:2386– 2394
- Nielsen (2001) Animal evolution: interrelationships of the living Phyla, 2nd edn. Oxford University Press, Oxford
- Nielsen C (2008) Six major steps in animal evolution: are we derived sponge larvae. Evol Dev 10:241–257
- Nichols SA (2005) An evaluation of support for order-level monophyly and interrelationships within the class Demospongiae using partial data from the large subunit rDNA and cytochrome oxidase subunit I. Mol Phyl Evol 34:81–96
- Peterson KJ, Sperling EA (2007) Poriferan ANTP genes: primitively simple or secondarily reduced? Evol Dev 9:405–408
- 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

- Richelle-Maurer E, Van de Vyver G (1999) Temporal and spatial expression of EmH-3, a homeobox-containing gene isolated from the freshwater sponge *Ephydatia muelleri*. Mech Ageing Dev 109:203–219
- Richelle-Maurer E, Boury-Esnault N, Itskovich VB, Manuel M, Pomponi SA, Van de Vyver G, Borchiellini C (2006) Conservation and phylogeny of a novel class of non-*Hox* genes of the *Antp*-superclass in Demospongiae (Porifera). J Mol Evol 63:222–230
- Ryan JF, Burton PM, Mazza ME, Kwong GK, Mullikin JC, Finnerty JR (2006) The enidarian–bialterian ancestor possessed at least 56 homeoboxes: evidence from the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis*. Genome Biol 7:R64
- Sperling EA, Pisani D, Peterson KJ (2007) Poriferan paraphyly and its implications for Precambrian palaeobiology. Geol Soc London Spec Publ 286:355–368
- Swofford DL (2000) PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4. Sinauer, Sunderland, Massachusetts
- Takahashi H, Kamiya A, Ishiguro A, Suzuki AC, Saitou N, Toyoda A, Aruga J (2008) Conservation and diversification of msx protein in metazoan evolution. Mol Biol Evol 25:69–82
- Telford MJ (2006) Animal phylogeny. Curr Biol 16:981-985
- Uhler J, Garbern J, Yang L, Kamholz J, Mellerick DM (2002) Nk6, a novel *Drosophila* homeobox gene regulated by vnd. Mech Dev 116:105–116
- Wang X, Lavrov DV (2007) Mitochondrial genome of the Homoseleromorph Oscarella carmela (Porifera, Demospongiae) reveals unexpected complexity in the common ancestor of sponges and others animals. Mol Biol Evol 24:363–373
- Wheland S, Goldman N (2001) A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. Mol Biol Evol 18:691–699
- Zhao S, Jiang H, Wang W, Mao B (2007) Cloning and developmental expression of the *Xenopus* Nkx6 genes. Dev Genes Evol 217:477–483

D Springer

# **C]** Conclusions et perspectives

### C.1 : Origine et évolution des facteurs de transcription

L'analyse de la composition du génome d'Amphimedon queenslandica en facteurs de transcription et plus particulièrement en gènes à homéoboîte de la super-classe ANTP représente une avancée majeure dans l'étude de l'origine et de l'évolution des facteurs de transcription. Cependant, comme noté précédemment, ces données issues d'une seule espèce ne sont pas forcément représentatives de l'état ancestral des éponges et donc de la composition en facteurs de transcription d'Urmétazoa. L'hypothèse du « protoNK » cluster, bien que fort intéressante, n'est pas soutenue par notre analyse phylogénétique intégrant des gènes d'éponges homoscléromorphes. Afin de pouvoir statuer sur la validité de cette hypothèse et donc sur les pertes secondaires potentielles chez Amphimedon queenslandica, l'ajout de données issues d'autres lignées d'éponges est donc indispensable. Actuellement, l'analyse des données issues d'un séquençage 454 d'ARNm normalisés chez Oscarella lobularis est en cours, en collaboration avec l'équipe du Professeur Pierre Pontarotti<sup>7</sup>. De même, des données de pyroséquençage chez une éponge calcaire (Sycon ciliatum) dans l'équipe de Maja Adamska<sup>8</sup>ont lieu en ce moment. L'évaluation de leur contenu en facteurs de transcription et plus particulièrement en gènes de la super-classe ANTP permettra à court terme d'éclairer ce point.

Cependant, il ne faut pas oublier que le contexte phylogénétique de la base de l'arbre et également que la position phylogénétique des éponges sont toujours incertains. Si la position basale des cténophores venait à se confirmer, l'acquisition d'un ou plusieurs génomes de ces organismes serait indispensable pour pouvoir avoir une vision précise de l'histoire évolutive de ces gènes (Pang et Martindale, 2008a). Pareillement, les hypothèses de monophylie ou paraphylie des éponges impliquent des scénarios évolutifs différents (Peterson et Sperling, 2007). S'il s'avère que le contenu en gènes ANTP des homoscléromorphes et des calcisponges est supérieur à celui d'*Amphimedon queenslandica*, cela signifierait soit:

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Equipe Evolution biologique et modélisation, Université de Provence, Marseille

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> Developmental signalling in marine sponges, Sar center, Bergen, Norvège



Figure 36 : (A) et (B) : le contenu en gène ANTP des démosponges s'avère inférieur à celui observé chez les autres lignées d'éponges. (A) Scénario résultant dans le cadre de la monophylie des éponges. (B) Scénario résultant dans le cadre de la paraphylie des éponges. (C) et (D) : le contenu en gène ANTP des démosponges s'avère identique (ou supérieur) à celui observé chez les autres lignées d'éponges. (C) Scénarios résultant dans le cadre de la monophylie des éponges. (D) Scénario résultant dans le cadre de la paraphylie des éponges. Vert : nombre de gènes ANTP restreint. Violet : nombre de gènes ANTP plus important. Rouge : perte secondaire, jaune : expansion.

(i) que des pertes secondaires spécifiques ont eu lieu dans cette lignée, dans l'hypothèse de monophylie (Figure 36A), soit (ii) qu'une vague de diversification intermédiaire ait eut lieu dans la lignée menant au groupe (homoscleromorphe + calciponges + eumétazoaires) dans l'hypothèse de paraphylie (Figure 36B). S'il s'avère que les autres lignées d'éponges présentent le même nombre ou un nombre inférieur de gènes qu'*Amphimedon*, deux possibilités se présenteront : (i) dans l'hypothèse de la monophylie, les éponges auraient soit initialement un nombre restreint de gènes ANTP, soit un nombre plus important de gènes ANTP suivis par des évènements de réduction de gènes qui auraient alors eu lieu de façon indépendante dans plusieurs lignées d'éponges ou chez l'ancêtre commun des éponges (Figure 36C) (ii) dans l'hypothèse de la paraphylie, le nombre de gènes ANTP serait restreint initialement (Figure 6D).

Une fois de plus, la résolution précise de la base de l'arbre reste un pré-requis à la validation de tout scénario évolutif de familles de gènes.

# C.2 : Les cellules à collerette sont-elles à l'origine des cellules neurosensorielles ?

Notre étude d'expression de gène chez *Oscarella lobularis* nous ont permis de mettre en évidence une expression localisée d'un gène apparenté aux  $NK_{6/7}$  dans les choanocytes et ainsi de faire le pendant avec l'hypothèse d'une possible homologie entre choanocytes et cellules neurosensorielles des autres animaux, proposée initialement par Jacobs et al., 2007. Dans l'état actuel des connaissances, nous ne pouvons nous permettre d'affirmer cela de façon catégorique. En effet, les relations d'orthologie sont peu soutenues et les conclusions basées sur un seul gène sont hasardeuses. Cependant, cette observation est fort intéressante et d'autres expériences pourraient aider à tester cette hypothèse. En effet, il serait utile de réaliser des expériences d'hybridation *in situ* avec ce gène lors de processus morphogénètiques autres: chez la larve cinctoblastula nageuse (qui ne possède pas de choanocytes) et également lorsqu'elle vient de se fixer (appelée à ce stade rhagon) ; lors d'expériences de régénération et également de dissociations / réagrégations cellulaires. Il serait également capital d'inhiber ce gène et d'observer les conséquences morphologiques de

cette inhibition. Par ailleurs, il serait également important de chercher d'autres homologues de gènes impliqués dans le système nerveux des bilatériens chez diverses éponges et de les localiser par hybridations *in situ* ou de localiser les protéines par immunohistochimie (Voir Chapitre V).

# **CHAPITRE V**

La voie de signalisation Notch



Figure 37 : (A) Voie de signalisation schématique permettant la transduction d'un signal *via* une série d'interrupteurs on/off. Le ligand se fixe au récepteur transmembranaire qui, de ce fait, subit des modifications au niveau de sa partie cytoplasmique. Une cascade est ainsi initiée dont la phase finale est la modification de l'expression des gènes cibles (Gerhart, 1999).

(B) Quatre voies principales de signalisation utilisent des mécanismes différents pour passer du mode répression par défaut à l'activation des gènes cibles (Barolo et Posakony, 2002). Dans le cas de la voie Notch, il s'agit du clivage du récepteur ; pour Wnt, la non dégradation d'un co-activateur ; pour Hh, le clivage d'un facteur de transcription et pour récepteur nucléaire, l'affinité du ligand pour un co-activateur. SPRE : signaling pathway response elements.

## A] Introduction

### A.1 : Voies de signalisation et développement

Les biologistes du développement ont depuis bien longtemps réalisé que les cellules individuelles d'un organisme pluricellulaire en développement ne suivent pas un parcours indépendant vers leur destin final. En effet, dès 1924, Spemann et Mangold, ont montré que la greffe de la lèvre dorsale du blastopore dans la partie ventrale d'une jeune gastrula de xénope conduisait à la formation d'un second axe embryonnaire complet contenant un tube neural parfaitement organisé issu de l'ectoderme ventral de l'hôte. Les cellules ectodermiques de la jeune gastrula ont donc été induites en cellules neurales par le mésoderme dorsal greffé. Ainsi, les cellules sont continuellement en communication avec d'autres cellules, proches ou lointaines, qui les guident au fur et à mesure et suivent un programme développemental précis et reproductible. On sait aujourd'hui que les voies de signalisation sont un moyen de communication intercellulaire indispensable à la réalisation et à la bonne coordination du développement embryonnaire (Pires-daSilva et Sommer, 2003). Chez les animaux, elles sont caractérisées par un ensemble de molécules qui transmettent un signal d'une cellule à une autre. Classiquement, les ligands de ces voies, soit secrétés (système paracrine) soit situés sur la membrane de la cellule émettrice (système juxtacrine), vont se fixer aux récepteurs d'une autre cellule. Suite à cette fixation, une cascade d'interactions moléculaires va se produire dans la cellule réceptrice, entrainant la modification de son activité transcriptionnelle via l'utilisation notamment de facteurs de transcription (Figure 37A) (Barolo et Posakony, 2002). Ainsi, des molécules portées ou émises par une cellule peuvent initier/moduler le programme d'expression de gènes d'une autre (Richards et Degnan, 2009). Etonnamment, il a été montré que seulement sept voies de signalisation étaient impliquées dans les processus développementaux majeurs des bilatériens. Ce sont les voies Hedgehog (Hh), Wint (Wnt) (Annexe III), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), receptor tyrosine kinase (RTK), Notch, Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT) et récepteur nucléaire (Gerhart, 1999). Elles sont utilisées de façon répétée pour accomplir des fonctions diverses tout au long du développement. Ces voies ont toutes en commun le fait d'activer des gènes cibles spécifiques de la cellule réceptrice, qui, par défaut, sont réprimés en absence de



Figure 38 : (A) La régulation fine de l'expression des gènes les cibles par voies de signalisation: (1) la liaison récepteur/ligand est insuffisante à une activation directe de la transcription ; (3) des activateurs locaux de la transcription sont insuffisants pour activer les gènes cibles ; (2) une action commune de la voie de signalisation et des activateurs locaux permet l'expression des gènes cibles dans les contextes appropriés. (Barolo et Posakony, 2002). (B) Phénotype des mutants Notch+/drosophile : de Comparaison de l'aile d'une drosophile sauvage et d'une drosophile hétérozygote mutante pour Notch. Des encoches sont visibles à l'extrémité des ailes ; la forme et les cellules de l'aile sont modifiées (Bouissac, 2005). (C) La voie Notch : la liaison du récepteur avec un de ses déclenche ligands deux extracellulaires clivages assurés par la protéase TACE et le complexe γ-sécrétase. Ceci permet la formation de l'ICN (ou NICD = domaine intracellulaire de Notch) qui est transloqué dans noyau où il régule l'expression de gènes cibles de type bHLH signal (système de type interrupteur aussi appelé transcriptional switch mechanisms). Cependant, les moyens mis en œuvre pour y arriver sont variés (Figure 37B). Chaque voie (Notch, Wnt, Hh et récepteur nucléaire) utilise un facteur spécifique (différent pour chacune des quatre voies) pour activer la transcription. Cette différence fondamentale entre ces quatre voies laisse supposer que l'évolution des mécanismes de « transcriptional switch » et plus précisément de répression par défaut a eu lieu de façon indépendante pour chacune d'elles (Barolo et Posakony, 2002). En effet, l'absence de signal pourrait suffire à maintenir les gènes cibles non exprimés, mais ce n'est pas le cas. Cela laisse supposer que cet état de répression par défaut est indispensable au bon fonctionnement des voies de signalisation, et a dû représenter un avantage sélectif au cours de la mise en place de ces voies. Deux autres caractéristiques communes à ces voies sont que l'activité propre des voies de signalisation est insuffisante pour activer fortement les gènes cibles, ainsi des activateurs de transcription doivent également intervenir. Ces trois caractéristiques des voies de signalisation ont pour conséquence que les gènes cibles sont exprimés de façon spécifique et régulés de manière fine. Ainsi, une seule voie de signalisation pourra être réutilisée et activer différents gènes cibles dans différents contextes tout au long du développement (Figure 38A) (Barolo et Posakony, 2002). Le fait que si peu de voies de signalisation régulent un grand nombre de processus développementaux peut également être expliqué par des phénomènes d'interactions entre voies de signalisation. En effet, il a été montré dans plusieurs cas des interactions, notamment entre les voies Notch, Wint et EGFR, qui permettent la régulation de certains composants des voies et donc de moduler les destins cellulaires (Flores et al., 2000 ; Shilo, 2009).

### A.2 : Fonctionnement général de la voie Notch chez les bilatériens

La mutation Notch a été mise en évidence chez la drosophile au milieu du XX<sup>e</sup> siècle (Poulson, 1937, 1940). La drosophile hétérozygote pour Notch (Notch+/Notch-) présente des encoches (notch en anglais) à l'extrémité des ailes (Figure 38B). La perte de fonction totale de Notch (homozygote Notch-/Notch-) entraine un phénotype embryonnaire létal caractérisé par une surproduction de neurones, appelé phénotype «neurogénique» (Bouissac, 2005). Initialement caractérisée chez la drosophile, cette voie repose sur un récepteur transmembranaire Notch, des ligands également transmembranaires Delta ou Jagged/Serrate présents sur les cellules voisines et de nombreux acteurs et membres secondaires de la voie



(voir la partie B pour avoir accès aux références qui décrivent les acteurs/modulateurs de la voie (Gazave *et al.*, 2009)). Chez les bilatériens, le récepteur Notch est fabriqué dans l'appareil de Golgi où il est clivé une première fois (S1) par une enzyme, la furine. Le récepteur migre alors vers la membrane de la cellule où il est intégré. S'il rencontre son ligand, la liaison entraine un deuxième clivage de ce récepteur par des enzymes métalloprotéiques (S2) de la famille TACE. Puis il est clivé une troisième fois par un complexe protéolitique : le complexe  $\gamma$ -sécrétase (S3). La partie intracellulaire du récepteur ainsi libérée est ensuite transloquée dans le noyau de la cellule où elle va jouer le rôle de facteur de transcription : elle va s'associer à d'autres protéines (CSL/suppressor of hairless Su(H)) et former un complexe transcriptionnel régulant la transcription de certains gènes de type bHLH (Figure 2C) (Bray, 2000 ; Bray, 2006 ; Kopan et Ilagan, 2009).

Généralement, le fonctionnement de la voie Notch n'est pas de définir directement l'identité cellulaire des cellules sur lesquelles elle s'exerce mais plutôt un état de compétence d'une cellule. Ainsi, chez les bilatériens, elle agit sur le devenir cellulaire selon trois mécanismes principaux : l'inhibition latérale, l'induction et de signalisation au cours de la division asymétrique (certains auteurs ne reconnaissent parfois que les deux premiers) (Bray, 1998a, 1998b ; Bray, 2006).

- L'inhibition latérale est le mécanisme d'action de la voie Notch le plus étudié. Il s'exerce au sein d'un groupe de cellules ayant initialement les mêmes potentialités développementales. Lorsqu'un petit déséquilibre (concernant les expressions de gènes) survient, une des cellules exprime plus fortement des ligands que des récepteurs. Ce déséquilibre est amplifié par une boucle de rétrorégulation (illustrée en Figure 40) et, au final, on obtient des cellules exprimant soit majoritairement le ligand soit majoritairement le récepteur (Figure 39A) (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995 ; Lai, 2004 ; Bouissac, 2005 ; Bray, 2006).
- Le mécanisme d'induction a lieu entre deux populations de cellules exprimant différemment la voie Notch. Une population exprime le ligand et l'autre (contigüe) exprime le récepteur. Les cellules exprimant le ligand activent la voie Notch dans les cellules réceptrices, modifiant leur compétence et créant ainsi une « frontière » cellulaire (Figure 39B) (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995 ; Lai, 2004).

Figure 39 (figures de la page précédente) Les modes d'action de la voie Notch : (A) L'inhibition latérale : Notch agit *via* des signaux inhibiteurs réciproques entre deux cellules qui, à l'origine, ont des potentialités identiques. 1- Des signaux réciproques (inhibition mutuelle) deviennent des signaux d'inhibition unidirectionnels. Notch inhibe la capacité de la cellule réceptrice du message (verte) de produire elle-même un signal inhibiteur, alors que la cellule émettrice du signal (rose) amplifie le signal inhibiteur par une boucle d'autorégulation. 2-L'exemple des ommatidies de l'œil de drosophile : en violet les cellules sont équivalentes, en bleu et rose elles ont des destins cellulaires différents. L'image au microscope confocal des ommatidies montre en rose l'expression de Notch dans un ou deux photorécepteurs.

(B) L'induction : 1- Les deux types cellulaires contigus ne sont pas équivalents et sont représentés en rose et en vert. Seule la cellule rose exprime le ligand, alors que seule la cellule verte exprime le récepteur Notch. Notch agit *via* des signaux unidirectionnels entre deux cellules. La cellule émettrice du signal (rose) active la voie Notch dans la cellule réceptrice du signal (verte). En réponse à ce signal, la cellule change de potentialité. 2- Notch peut établir une frontière cellulaire, c'est notamment le cas lors de la formation de l'aile de la drosophile. Les cellules exprimant le ligand de la voie sont marquées en violet.

(C) : Signalisation au cours de la division asymétrique. 1- Une cellule précurseur contient un facteur et se divise de façon asymétrique pour générer deux cellules filles distinctes. Une des cellules filles contiendra le facteur, régulant négativement l'activité du récepteur (ici *Numb*), et devient cellule émettrice du signal. L'autre cellule fille devient alors cellule réceptrice et changera de potentialité. 2- L'exemple de la lignée cellulaire des SOP (sensory organ precursor) de drosophile. L'image au confocal montre la distribution asymétrique de Numb dans deux cellules filles de la lignée cellulaire des SOP (en rose : le noyau) (Bouissac, 2005 ; Bray, 2006)



Figure 40: Voie Notch et neurogenèse chez la drosophile. Dans une groupe de cellules proneurales équivalentes, les gènes Delta, Notch et un gène proneural (de type bHLH) sont exprimés en même quantité. Suite au mécanisme d'inhibition latérale, l'expression du gène proneural est inhibée dans une cellule et activée dans l'autre (progéniteur neural) qui va entamer différentiation sa neuronale (Bertrand et al., 2002).

Le mécanisme de signalisation au cours de la division asymétrique s'exerce entre deux cellules filles issues d'une cellule précurseur et dont seule l'une d'elle aura hérité d'un régulateur négatif de l'activité du récepteur (souvent Numb). Cette cellule deviendra alors émettrice et l'autre réceptrice (Figure 39C) (Lai, 2004).

Ces trois mécanismes sont impliqués dans de nombreux processus développementaux : différentiation, proliférations cellulaires, apoptose, formation des somites, développement des yeux ... (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). Ils jouent également un rôle prépondérant au niveau de la neurogenèse.

Chez les cnidaires, bien qu'assez peu étudiée, la voie semble fonctionner suivant le même principe : le clivage du récepteur *via* un complexe protéique impliquant la préséniline permet la translocation du domaine intracellulaire dans le noyau (Kasbauer *et al.*, 2007).

## *A.3* : Voie Notch et neurogenèse

L'implication de la voie Notch dans la neurogenèse a été grandement étudiée chez la drosophile, où elle intervient pour réguler les destins cellulaires à différents niveaux. Premièrement, elle agit, via le processus d'inhibition latérale, dans la sélection des cellules qui vont devenir des précurseurs neuronaux ou progéniteurs à partir d'un ensemble de cellules équivalentes nommées cellules proneurales. L'expression de gènes proneuraux de type bHLH dote les cellules proneurales d'un potentiel neural, elles peuvent devenir des progéniteurs. Une boucle de régulation de l'expression de ces gènes entre les cellules d'un ensemble permet qu'une seule cellule retienne l'expression des gènes bHLH et devienne un précurseur neuronal, les autres cellules étant inhibées. En absence d'activation par la voie Notch, toutes les cellules expriment ces gènes proneuraux et deviennent des cellules neuronales. Par opposition, quand le signal Notch est constant, aucune cellule ne devient neuronale, elles restent toutes épidermiques. Ainsi, dans ce processus la voie Notch contrôle un destin cellulaire binaire (neuronal ou épidermique) via l'inhibition d'un programme neuronal (Figure 40) (Bertrand et al., 2002; Cau et Blader, 2009). La voie Notch agit une deuxième fois durant la neurogenèse chez la drosophile pour spécifier la sous-identité neurale (neurones, cellules gliales...) des précurseurs neuronaux (sélectionnés précédemment par le mécanisme d'inhibition latérale). Chez les vertébrés, la voie Notch est également impliquée dans la

sélection des cellules progénitrices *via* l'activation des gènes proneuraux de type bHLH et la spécification secondaire de ces cellules en neurones ou cellules gliales (Bertrand *et al.*, 2002 ; Cau et Blader, 2009).

La voie Notch chez les cnidaires a été assez tardivement identifiée par rapport aux autres voies de signalisation, bien que quelques composants aient été précédemment identifiés, le récepteur et le ligand manquaient (Steele, 2002). A l'heure actuelle, seules deux études ont été publiées chez le modèle *Hydra* (Kasbauer *et al.*, 2007 ; Khalturin *et al.*, 2007). La voie Notch ne semble pas être impliquée dans la spécification des neurones de cnidaires. Par contre, ces études suggèrent une implication de la voie Notch dans la nématogenèse (Kasbauer *et al.*, 2007) et plus précisément dans la différenciation des nématoblastes (Khalturin *et al.*, 2007). Les nématocytes sont des cellules neurosensorielles, et elles sont issues, tout comme les neurones, de cellules souches interstitielles. Ainsi, suite à la démonstration de l'implication de la voie, chez l'ancêtre commun des eumétazoaires, serait la mise en place d'un système neurosensoriel et non uniquement nerveux.

Aucune donnée concernant les gènes de la voie Notch chez les cténophores n'a été rapportée et une seule étude a été publiée chez les éponges (voir suite du chapitre) (Richards *et al.*, 2008).
# **B]** Etude de l'origine et de l'évolution de la voie Notch

### B.1 : Présentation de l'article

Comme nous l'avons souligné précédemment, malgré le rôle important de la voie Notch dans les processus de détermination cellulaire, en particulier lors de la neurogenèse, cette voie est très bien caractérisée uniquement chez les bilatériens et peu de données sont connues sur l'apparition et la structure ancestrale de ce complexe constitué d'une multitude de composants. Dans cette étude, nous avons donc entrepris de rechercher les 22 composants principaux de la voie chez 35 espèces d'eucaryotes (représentatifs des huit principaux clades : Opistochonta, Amoebozoa, Plantae, Alveolata, Heterokonta, Discicristata, Excavata and Rhizaria). Après avoir statué sur la présence ou l'absence de ces gènes pour chacune des espèces choisies, nous avons émis des hypothèses concernant leur origine en nous basant sur l'hypothèse phylogénétique de Baldauf (Baldauf, 2003). Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'origine très ancienne de certains composants et/ou modulateurs de la voie et également émis des hypothèses quant à leurs fonctions ancestrales. De plus, certains évènements de transferts latéraux de gènes ont pu également être envisagés pour certaines protéines. Nous avons également recherché la présence des domaines de cinq protéines principales à l'échelle des eucaryotes. Nous avons par la suite étudié plus particulièrement les structures et arrangements en domaines des composants majeurs de la voie : les ligands (Delta et Jagged) et le récepteur Notch, puis réalisé des analyses phylogénétiques pour ces gènes (ainsi que pour la majorité des composants de la voie). Nous avons ainsi pu imaginer deux scénarios alternatifs concernant l'origine et l'évolution des ligands. Cette étude sur l'origine et l'évolution des composants de la voie Notch présente une description complète de cette voie à l'échelle des eucaryotes.

Ce travail a fait l'objet d'un article dont je suis 1<sup>er</sup> auteur paru dans BMC Evolutionary Biology en 2009.

*B.2*: *Article* 6: *Notch signalling pathway origin and evolution: an overview from eukaryotic genomes* 

### Research article



**Open Access** 

# Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes

Eve Gazave<sup>1</sup>, Pascal Lapébie<sup>1</sup>, Gemma S Richards<sup>2</sup>, Frédéric Brunet<sup>3</sup>, Alexander V Ereskovsky<sup>1,4</sup>, Bernard M Degnan<sup>2</sup>, Carole Borchiellini<sup>1</sup>, Michel Vervoort<sup>5,6</sup> and Emmanuelle Renard<sup>\*1</sup>

Address: <sup>1</sup>Aix-Marseille Universités, Centre d'Océanologie de Marseille, Station marine d'Endoume - CNRS UMR 6540-DIMAR, rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille, France, <sup>2</sup>School of Biological Sciences, University of Queensland, Brisbane, QLD 4072, Australia, <sup>3</sup>Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Université de Lyon, CNRS UMR 5242, INRA, IFR128 BioSciences Lyon-Gerland, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46, Allée d'Italie, 69007 Lyon, France, <sup>4</sup>Department of Embryology, Faculty of Biology and Soils, Saint-Petersburg State University, Universitetskaja nab. 7/9, St Petersburg, Russia, <sup>5</sup>Institut Jacques Monod, UMR 7592 CNRS/Université Paris Diderot - Paris 7, 15 rue Hélène Brion, 75205 Paris Cedex 13, France and <sup>6</sup>UFR de Biologie et Sciences de la Nature, Université Paris 7 - Denis Diderot, 2 place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France

Email: Eve Gazave - eve.gazave@univmed.fr; Pascal Lapébie - pascal.lapebie@univmed.fr; Gemma S Richards - s355446@student.uq.edu.au; Frédéric Brunet - Frederic.Brunet@ens-lyon.fr; Alexander V Ereskovsky - aereskovsky@hotmail.com; Bernard M Degnan - b.degnan@uq.edu.au; Carole Borchiellini - carole.borchiellini@univmed.fr; Michel Vervoort - vervoort@cgm.cnrs-gif.fr; Emmanuelle Renard\* - emmanuelle.renard@univmed.fr

> Received: I July 2009 Accepted: I3 October 2009

\* Corresponding author

Published: 13 October 2009

BMC Evolutionary Biology 2009, 9:249 doi:10.1186/1471-2148-9-249

This article is available from: http://www.biomedcentral.com/1471-2148/9/249

© 2009 Gazave et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<u>http://creativecommons.org/licenses/by/2.0</u>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

#### Abstract

**Background:** Of the 20 or so signal transduction pathways that orchestrate cell-cell interactions in metazoans, seven are involved during development. One of these is the Notch signalling pathway which regulates cellular identity, proliferation, differentiation and apoptosis *via* the developmental processes of lateral inhibition and boundary induction. In light of this essential role played in metazoan development, we surveyed a wide range of eukaryotic genomes to determine the origin and evolution of the components and auxiliary factors that compose and modulate this pathway.

**Results:** We searched for 22 components of the Notch pathway in 35 different species that represent 8 major clades of eukaryotes, performed phylogenetic analyses and compared the domain compositions of the two fundamental molecules: the receptor Notch and its ligands Delta/Jagged. We confirm that a Notch pathway, with true receptors and ligands is specific to the Metazoa. This study also sheds light on the deep ancestry of a number of genes involved in this pathway, while other members are revealed to have a more recent origin. The origin of several components can be accounted for by the shuffling of pre-existing protein domains, or *via* lateral gene transfer. In addition, certain domains have appeared *de novo* more recently, and can be considered metazoan synapomorphies.

**Conclusion:** The Notch signalling pathway emerged in Metazoa *via* a diversity of molecular mechanisms, incorporating both novel and ancient protein domains during eukaryote evolution. Thus, a functional Notch signalling pathway was probably present in Urmetazoa.

Page 1 of 27 (page number not for citation purposes)

#### Background

The emergence of multicellularity, considered to be one of the major evolutionary events concerning life on Earth, occurred several times independently during the evolution of Eukaryota in the Proterozoic geological period [1]. Multicellular organisms are not only a superimposition of the fundamental unit of life, namely the cell; the emergence of multicellularity further implies that cells must communicate, coordinate and organise. In Embryophyta and Metazoa, higher levels of differentiation and organization of cells resulted in the emergence of organs and their organisation into complex body plans. Reaching this critical step required the elaboration of sophisticated intercellular communication mechanisms [2,3]. Cell-cell interactions through signal transduction pathways are therefore crucial for the development and the evolution of multicellular organisms. The modifications of these signal transduction pathways explain the macroevolution process observed. In metazoans, fewer than 20 different signal transduction pathways are required to generate the observed high diversity of cell types, patterns and tissues [4]. Among them, only seven control most of the cell communications that occur during animal development: Wnt; Transforming Growth Factor β (TGF-β); Hedgehog; Receptor Tyrosine Kinase (RTK); Jak/STAT; nuclear hormone receptor; and Notch [5,6]. These pathways are used throughout development in many and various metazoans to establish polarity and body axes, coordinate pattern formation and choreograph morphogenesis [4]. The common outcome to all of these pathways is that they act, at least in part, through the regulation of the transcription of specific target genes by signal-dependent transcription factors [6].

The Notch signalling pathway is a major direct paracrine signalling system and is involved in the control of cell identity, proliferation, differentiation and apoptosis in various animals (reviewed in [7-12]). Notch signalling is used iteratively in many developmental events and its diverse functions can be categorized into two main modalities "lateral inhibition" and "boundaries/inductive mechanisms" [8,13]. During lateral inhibition, Notch signalling has mainly a permissive function and contributes to binary cell fate choices in populations of developmentally equivalent cells, by inhibiting one of the fates in some cells and therefore allowing them to later adopt an alternative one. Lateral inhibition is a key patterning process that often results in the regular spacing of different cell types within a field. The Notch pathway may also have more instructive roles, whereby signalling between neighbouring populations of different cells and induces the adoption of a third cell fate at their border, establishing a developmental boundary [14,15].

A large number of studies, mainly conducted on Drosophila, Caenorhabditis and vertebrates, have characterized

the molecular properties and functions of the main components and auxiliary factors of the Notch pathway. These are strongly conserved in bilaterians (Figure 1 modified from [16]). Both the Notch receptor and its ligands (Delta or Jagged/Serrate also known as DSL proteins) are type I transmembrane proteins with a modular architecture. In eumetazoans, the Notch protein is classically considered to be composed of an extracellular domain (NECD) that comprises several EGF and LNR motifs, an intracellular domain (NICD) that includes ANK domains and a PEST region [7,8,17,18]. The Notch protein is synthesized as an inactive precursor that has to be cleaved three times and to undergo various post-translational modifications to become active [19-22]. In the Golgi apparatus, the first cleavage (S1) is done by the Furin protease resulting in two fragments (NICD and NECD) that subsequently undergo O-fucosylation (by O-Fucosyltransferase) and glycosylation (by Fringe). Upon ligand binding, the second cleavage (S2) occurs by the metalloproteases ADAM 10 and 17 [19-21]. The final cleavage (S3) is performed by the y-secretase complex (Presenilin-Nicastrin-APH1-PEN2). These cleavages result in the release, upon ligand binding, of NICD into the cytoplasm and its subsequent translocation to the nucleus. There, NICD interacts with the CSL (CBF1, Su(H), Lag-1)/Ncor/SMRT/Histone Deacetylase (HDAC) transcriptional complex and recruits the coactivator Mastermind and a Histone Acetylase (HAC), thus activating the transcription of target genes in particular the HES/E(Spl) genes (Hairy/Enhancer of Split) [9].

In addition to these core components of the Notch pathway, several other proteins are used to regulate Notch signalling in some cellular contexts, and act either on the receptor Notch or on the ligand DSL (Figure 1). Some of these regulators modulate the amount of receptor available for signalling [23]. Numb, the NEDD4/Su(dx) E3 ubiquitin ligases, and Notchless are important negative regulators, while Deltex is considered to antagonize NEDD4/Su(dx) and therefore to be an activator of Notch signalling [24,25]. Strawberry Notch (Sno), another modulator of the pathway whose role is still unclear, seems to be active downstream and disrupts the CSLrepression complex [26]. Regulation may also occur at the level of ligand activity via the E3 ubiquitin ligases Neuralized and Mindbomb [27,28].

Most of what we know about the Notch signalling pathway comes from studies conducted on a few bilaterian species. Recently, studies have shown the existence of a Notch signalling pathway in non-bilaterian species, such as the cnidarian *Hydra* and the sponge *Amphimedon*, and its putative functions in the former species [29,30]. However, the ancestral structure, functionality and emergence of this complex multi-component signalling system are still open questions. Few studies have been initiated to



#### **Figure** I

Major components and auxiliary factors of the Notch signalling pathway as described in Bilateria (modified from [16]). Most of the mentioned components are studied hereafter. S1 to S3 represent the cleavage sites. See Table 1 for complete names and functions of the components.

understand how signalling pathways appeared and evolved beyond the Bilateria [4-6] but the recent sequencing of the first sponge genome, Amphimedon queenslandica has opened new perspectives for studying the origin and evolution of signalling pathways in the Metazoa [31-35]. With the goal of illuminating the early evolution of the Notch pathway, we have therefore undertaken a comparative genomic study of the components of this pathway across the Eukaryota. Our study encompasses 35 species (31 with fully sequenced genomes) covering the 8 major clades of eukaryotes [36] (Figure 2), and includes the 22 main components of the Notch pathway (Table 1). We have also paid special attention to the evolution of domain composition (within the Metazoa) of the multidomain proteins Notch, Delta, Mindbomb, Su(H) and Furin, to investigate whether domain shuffling has occurred during their evolution, as in other signalling pathways [31,37].

This wide genomic comparison reveals that most of the Notch components are present in all the metazoan species

studied, including putative basal metazoans such as sponges and placozoan, suggesting that a functional Notch pathway was already present in the last common ancestor of present-day metazoans and was subsequently strongly conserved during metazoan evolution. While many of the Notch pathway components are also shared with non-metazoan eukaryote lineages, thus suggesting a more ancient origin, nine of the components are metazoan-specific, including the Notch receptor and the DSL ligands. This indicates that while the Notch pathway is a metazoan synapomorphy, it has been assembled through the co-option of pre-metazoan proteins, and their integration with novel metazoan-specific molecules acquired by various evolutionary mechanisms.

#### Results

# Genome-wide identification of the main Notch signalling pathway components in eukaryotes

To understand more precisely the evolution of the Notch pathway at the scale of the eukaryotes, we systematically searched for all the main Notch pathway elements in com-

Page 3 of 27 (page number not for citation purposes)

Component type/role	Component name and abbreviation		
Receptor	Notch		
Ligands	Delta/Jagged		
Fucosyltransferase	O-fucosyltransferase (O-fut)		
Glycosyltransferase	Fringe		
Cleavage S1	Furin		
Cleavage S2	ADAM 17 = TACE		
Metalloproteases	ADAM 10 = Kuzbanian		
Cleavage S3	Presenilin (Pres)		
$\gamma$ -secretase complex	Anterior Pharynx defective I (APHI) Presenilin Enhancer 2 (PEN2)		
Transcriptional complex	CSL (CBFI, Su(H), Lag-1) Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid receptors (SMRT)		
Targets	Hairy Enhancer of Split (HES)		
Ligand Regulation	Neuralized (Neur) Mindbomb (Mib)		
Receptor Regulation	Deltex NEDD4/Suppressor of Deltex (Su(dx)) Mastermind (MAM) Numb Notchless (Nle) Strawberry notch (Sno)		

Table I: Proteins implicated in the Notch pathway and their known functions

pletely sequenced genomes and Expressed Sequence Tag (EST) data of 35 different eukaryote species (Figure 2). Table 1 lists the 22 genes that we analysed and summarizes their functions in the Notch pathway (see also Figure 1). We included in this list both genes that encode core components of the Notch pathways (such as receptor, ligands, and molecules involved in receptor processing) and genes that encode modulators of the pathway not used in all cases of Notch signalling (such as Numb and Notchless) [23]. We selected 35 species representative of the major clades of eukaryotes [36]: 18 metazoans, 4 fungi (including one microsporidia), 1 choanoflagellate, 2 amoebozoans, 2 species of plants (one embryophyta and one volvocale), 2 alveolates, 2 heterokonts, 2 species of discicristates, 1 species of excavates and 1 rhizaria. Figure 2 provides the full list of the chosen species with their assumed phylogenetic position and internet links to the genomic databases.

We performed BLAST searches [38] to assess the presence or absence of Notch pathway genes in the sampled species, as described in the methods section. In most cases, the Notch pathway elements are multidomain proteins and share some of their domains with other proteins. For each target protein, only the combined occurrence of all requisite domains was considered diagnostic for identification. We systematically defined a diagnostic domain organization for each target protein (Table 2) and identified genes as detailed in the methods section. We also constructed multiple alignments for each protein and performed phylogenetic analyses to confirm the orthology relationships (Additional files 1 and 2). Figure 3 summarizes the output of our analyses: genes were scored as "present" when all the domains were identified, "incomplete" when some domains were missing, or "absent" when blast searches gave no significant result. For EST libraries, as the absence and the incomplete status of genes cannot be definitive due to the partial nature of this

Opistokonta	Fungi	Dikarya	Ascomycota	Schizosaccharomyces pombe	WGS	NCBI
Opistokonta	Fungi	Dikarya	Ascomycota	Saccharomyces cerevisiae	WGS	NCBI
Opistokonta	Fungi	Dikarya	Basidiomycota	Ustilago maydis	WGS	NCBI
Opistokonta	Microsporidia	Unikaryonidae	an a	Encephalitozoon cuniculi	WGS	NCBI
Opistokonta	Choanoflagellata			Monosiga brevicollis	WGS	JGI
Opistokonta	Metazoa	Nematoda	Chromadorea	Caenorhabditis elegans	WGS	NCBI
Opistokonta	Metazoa	Annelida		Helobdella robusta	WGS	JGI
Opistokonta	Metazoa	Hexapoda	Insecta	Aedes aegypti	WGS	TIGR
Opistokonta	Metazoa	Echinodermata	Eleutherozoa	Strongylocentrotus purpureus	WGS	NCBI
Opistokonta	Metazoa	Mollusca	Gastropoda	Lottia gigantea	WGS	JGI
Opistokonta	Metazoa	Chordata	Cephalochordata	Branchiostoma floridae	WGS	JGI
Opistokonta	Metazoa	Chordata	Craniata	Danio rerio	WGS	NCBI
Opistokonta	Metazoa	Chordata	Craniata	Xenopus tropicalis	WGS	JGI
Opistokonta	Metazoa	Chordata	Craniata	Gallus gallus	WGS	NCBI
Opistokonta	Metazoa	Chordata	Craniata	Homo sapiens	WGS	NCBI
Opistokonta	Metazoa	Chordata	Urochordata	Ciona intestinalis	WGS	JGI
Opistokonta	Metazoa	Cnidaria	Anthozoa	Nematostella vectensis	WGS	JGI
Opistokonta	Metazoa	Cnidaria	Hydrozoa	Hydra magnipapillata	WGS	Compagen
Opistokonta	Metazoa	Ctenaria		Pleurobrachia pileus	EST	private data M. Manuel
Opistokonta	Metazoa	Ctenaria		Mnemiopsis leidyi	EST	NCBI trace
Opistokonta	Metazoa	Placozoa		Trichoplax adhaerens	WGS	JGI
Opistokonta	Metazoa	Porifera	Demospongiae	Amphimedon queenslandica	WGS	NCBI
Opistokonta	Metazoa	Porifera	Homoscleromorpha	Oscarella carmela	EST	specific blast server S. Nichols
Amoebozoa	Dictyostelida			Dictyostelium discoidum	WGS	NCBI
Amoebozoa	Pelobionta			Entamoeba histolytica	WGS	TIGR
Plantae	Viridiplantae	Embryophyta		Arabidopsis thaliana	WGS	NCBI
Plantae	Viridiplantae	Volvocaceae		Volvox carteri	WGS	JGI
Rhizaria	Cercozoa			Bigelowiella natans	EST	PEP
Alveolata	Apicomplexa			Plasmodium falciparum	WGS	NCBI
Alveolata	Ciliophora			Tetrahymena thermophila	WGS	NCBI
Heterokonta	Oomycota			Phytophthora sojae	WGS	JGI
Heterokonta	Bacillariophyta			Phytophthora ramorum	WGS	JGI
Discicristates	Euglenozoa	Kinetoplastidia		Leishmania major	WGS	NCBI
Discicristates	Heterolobosea			Naegleria gruberi	WGS	JGI
Excavata	Parabasalia			Trichomonas vaginalis	WGS	NCBI

List of the 35 species selected for the study, representing the 8 major clades of eukaryotes. Colour code: Opistokonta (blue); Amoebozoa (light blue); Plantae (green); Rhizaria (yellow); Alveolata (orange); Heterokonta (pink); Discicristata (violet); Excavata (grey). Data sets and data sources are also indicated. WGS: whole genome available; EST: only EST available. *O. carmela*: <u>http://cigbrowser.berkeley.edu/cgi-bin/oscarella/nph-blast.pl</u> Compagen: <u>http://compagen.zoologie.uni-kiel.de/</u> index.html; PEP: <u>http://amoebidia.bcm.umontreal.ca/pepdb/searches/welcome.php</u>. JGI: <u>http://genome.jgi-psf.org/</u> tre\_home.html. NCBI: <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</u>. TIGR: <u>http://www.tigr.org/db.shtml</u>.

type of data, we chose to indicate "present" only when all domains were retrieved. Detailed domain composition for each gene in each species is presented in the Additional file 3.

Our data confirm the strong evolutionary conservation of the Notch pathway in bilaterians as all components are present in almost all the analysed bilaterian species (Figure 3). There are two exceptions to this rule, Fringe which is absent from the genome of two protostomes, Caenorhabditis and Helobdella, and Mastermind is not found in 5 of the studied bilaterian species across both protostomes and deuterostomes. The latter case is puzzling given the documented importance of Mastermind in both vertebrates and Drosophila [39,40] and its presence in the non-bilaterian species Nematostella (Figure 3). This suggests that Mastermind has been repeatedly lost in various bilaterian species. Alternatively, as the sequence similarity between the Mastermind genes in Drosophila and vertebrates is quite weak [41], these genes may be difficult to track by sequence similarity searches. Our data also indicate that the overall Notch pathway conservation extends to non-bilaterian species. Indeed, most pathway components can be identified in the cnidarians Nematostella and Hydra, in the placozoan Trichoplax and the sponge Amphimedon (Figure 3). We can therefore conclude that most Notch pathway components were already present in the last common ancestor of all metazoans, the Urmetazoa.

Four genes were not found complete outside bilaterians, SMRT, Furin, Numb and Neuralized, suggesting that these genes are specific to bilaterians (Figure 3). Genes encoding proteins with a SANT domain (which is found in bilaterian SMRT) are found in non-bilaterians, but the sequence similarity is too weak to establish that some are

Proteins	Diagnostic domains	References
Notch	LNR/EGF/ANK	[23]
Delta	DSL/EGF	[23]
Fringe	Fringe	[80]
Adam 10/17	ZNMc/Disin	[139]
Pres	Peptidase A22	[140]
Nicastrin	M20-dimer superfamily	[141]
APHI	APH1 superfamily	[63]
PEN2	-	[63]
CSL/Su(H)	lag1/IPT RBJ Kappa/beta trefoil	[142]
MAM	Maml - 1	[143]
Numb	numbF/PH-like	[144]
Sno	ABC-ATPase	[26]
Neur	Neur/Zinc finger Ring	[145]
Mib	Mib-herc2/ANK/ZF ring/ZZ Mind	[28]
Deltex	WWE/ZF ring	[25]
NEDD4/Su(dx)	C2/WW/HECT	[146]
Nle	NLE/WD40	[72]
Furin	subtilisin/proprotein convertase/furin	[130]
O-fut	2	[147]
SMRT	SANT	[148]
HES	HLH/Hairy orange	[149]

#### Table 2: Domains considered as diagnostic for each protein

bona fide SMRT genes. The case of the Furin protein is puzzling. This protein pertains to the proprotein convertase subtilisin/kexin family (PCSK) [42]. In the demosponge *Amphimedon* and the choanoflagellate, there are some proteins of the PCSK family and some of them possess the diagnostic domains of the Furin proteins (data not shown). Nevertheless, the phylogenetic analysis revealed that these proteins do not group with bilaterian Furins, however the latter are paraphyletic in the phylogenetic tree (Additional file 2). In the case of Neuralized, while Neuz domains are found in non-bilaterians, they are only found in association with a RING binding domain in the Bilateria. In the same way, Ph-like domains of Numb are only found in association with a NumbF domain in bilaterians. The gene *Mastermind* is only found in eumetazoans and two others, *Fringe* and *Mindbomb*, are found in *Amphimedon* but not in *Trichoplax* (Figure 3).

The absence of some components in some non-bilaterian species may represent a progressive elaboration of the pathway during early metazoan evolution, or else may correspond to secondary losses in some lineages. How-



**Presence or absence of Notch signalling pathway components and auxiliary factors in eukaryotes.** Colour code: In black: genes present. In white: genes absent. In grey: not all diagnostic domains found. In white with an asterisk: incomplete data (EST) do not allow definitive conclusions. In curly bracket: the four members of the  $\gamma$ -secretase complex. Asco = Ascomycota; Basidio = Basidiomycota; CHOANO = Choanoflagellata; DICTYO = Dyctiostellida; PELO = Pelobionta; VIRIDI = Viridiplantae; Embryo = Embryophyta; Volvo = Volvolcaceae; APIC = Apicomplexa; OOMY = Oomycota; BACILLA = Bacillariophyta; EUGLENO = Euglenozoa; Kineto = Kinetoplastida; HETEROLO = heterolobozoa.

ever, these data can be difficult to interpret in terms of the evolution of the Notch pathway, as the phylogenetic relationships of the aforementioned non-bilaterian species are still controversial [43-45]. Nevertheless, we decided to base our discussion on the metazoan relationships hypothesised in the most recent phylogenomic study [46] as we believe it to be the most robust and complete analysis to date.

Our data so far indicate that most of the Notch pathway components were already present in Urmetazoa. Interestingly, among the 22 targeted genes, only nine are specific to metazoans (Notch, Delta, Furin, Mastermind, Numb, Neuralized, Mindbomb, HES and SMRT). Strikingly, among these, nine are the genes encoding the ligand and the receptor, suggesting that the canonical Notch pathway only exists in metazoans. Indeed, in the genome of the choanoflagellate Monosiga, no Notch gene has been found, only cassettes of some protein domains encoded on separate genes have been reported [47]. Of note, we also found another gene in this species that possesses the domain arrangement of a Notch gene (1 signal peptide, 1 EGF domain, 2 LNR domains, a transmembrane domain and 3 ANK domains, Additional file 4). While this gene contains the minimum set of diagnostic Notch domains, it has very weak sequence similarity to Notch genes, and in the absence of further evidence we choose here to name it "Notch-like". Nevertheless, we can not exclude that a "protoNotch" receptor might have been already present in Holozoa.

13 components are found in various other eukaryote taxa; some are likely to have appeared during early eukaryote evolution and may even have been present in the last common ancestor of present-day eukaryotes (LECA). Others seem to have specifically appeared in the opisthokont lineage. Figure 4 represents the possible scenarios of emergence and loss of the various Notch components, inferred from the most recent and robust phylogenetic hypotheses [45,46] and on the basis of the parsimony principle. Four genes of this pathway seem to have appeared early in evolution and are inferred to have been present in the LECA. These include Notchless (Nle) and three of the four genes coding for proteins implicated in the so-called "y-secretase complex". Indeed, the Presenilin gene is shared by all eukaryotes (except Fungi + microsporidies and alveolates) whereas Nicastrin and APH1 are found in the Holozoa, the Amoebozoa, the Plantae and the Heterokonta. Interestingly, none of these genes are found in species of Fungi + Microsporidia and Alveolata, suggesting a secondary loss. For other genes (3) that are shared by fewer taxa, it is difficult to state whether they were present in the LECA and lost various times, or acquired independently: this is the case for PEN2, Strawberry Notch (Sno), the role of which in the Notch pathway is not yet clear, and Fringe (a Fringelike gene is present in plants and Excavata). All other genes originated more recently, in the last common ancestor of opisthokonts (Suppressor of Hairless (Su(H))[48]; Suppressor of Deltex (NEDD4/Su(dx)). This might also be the case for the two Adam genes. We cannot confidently assign the Adam genes we found in Fungi and Microsporidia to a particular Adam group; however these genes are most closely related to metazoan Adam 10 and 17 families (see Additional file 2) as already reported by another study on Aspergillus fumigatus [49]. Other genes are specific to holozoans (O-Fut; Deltex).



**Figure 4** 

**Origin of Notch signalling pathway components in Unikonta (modified from** [16]). Each colour represents the origin (see figure inset for the colour code) of the gene inferred from our study on the basis of the phylogenetic hypothesis proposed in [45,46].

For the ctenophore species (*Mnemiopsis* and *Pleurobrachia*) as well as the homoscleromorph sponge *Oscarella*, only a few target genes were identified in the available non exhaustive EST databases and we were unable to conclude whether or not the remaining genes are present in those taxa.

#### Focus on Notch and DSL proteins evolution in metazoan: phylogenetic analyses and domain composition arrangement

We chose to focus our further analyses on the two main molecules of the pathway, Notch and DSL, and study their evolution in metazoans. We first performed phylogenetic analyses using both Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) approaches and then investigated the domain organizations of each. Topologies obtained in our phylogenetic analyses are not fully resolved, as previously noticed for the Notch ligands [50-52]. Long branch attraction bias (LBA) may be suspected in some cases and, as previously reported by different authors [53,54], ML appears more sensitive to LBA than BI. Concerning domain composition and organization, generally all the diagnostic domains in *Delta* or *Notch* genes are present in bilaterian sequences, but some domains seem to be lacking in a few species. In these cases, we can not state whether this is due to prediction errors, sequencing gaps in the available genome sequences or secondary losses. When the available software prediction is equivocal, important conserved residues can often be identified in the regions where domains would be expected, suggesting functional conservation. Despite these technical limits, our analysis presents several features of interest.

First, a single *Notch* gene is found in most species (Figure 5, Additional file 5), except in vertebrates (from 2 to 4 genes) and in the annelid *Helobdella* (2 genes). In the former case, this is most probably due to the well documented occurrence of two whole genome duplication

events in this lineage [55]. In the latter case, it may correspond to a recent duplication, limited to an annelid lineage. Indeed, the two Helobdella genes form a monophyletic group in our trees (Figure 5, Additional file 5) and only a single Notch gene has been found in the genome of another annelid species, Capitella sp. 1 [56]. In the Bayesian analysis, we note that the sequences from bilaterians form a monophyletic group and the cnidarian sequence clearly appears more related to bilaterian sequences than to other non-bilaterian sequences (PP: 0.99). The receptor Notch is considered to be made of several domains: EGF repeats (Epidermal Growth factor: about 30 to 40 amino acids, containing six conserved cysteines), three LNR (lin-notch repeat) or Notch domains, two enigmatic domains NOD and NODP (their roles are unknown), a RAM 23 domain, a PEST domain and several Ankyrin repeats (Figure 6). The number of EGFs is variable and spans from 10 in Caenorhabditis to 36 in humans. The NOD and the NODP are absent in sponges and in some bilaterian species. The absence of a signal peptide is observed in 8 of the 25 sequences, and the PEST domain is absent at the C-terminus of three sequences (Figure 6).

Second, in the DSL family (Figure 7, Additional file 6) Jagged is absent from placozoans and sponges and present (1 to 4 copies) in all other studied metazoans. Delta is present in all metazoan species of our study, and in contrast to Jagged, is also found in non-eumetazoans. The number of copies of Delta is also variable but is notably high (7 copies) in the gastropod snail Lottia. We also note that 5 copies are present in the sponge genome, which is remarkably high in comparison to the other non-bilaterians such as Trichoplax and Nematostella. In spite of the differences between the ML and BI topologies and the weak statistical support of deep nodes in both analyses, we are able to draw some conclusions about the evolution of the DSL family. In the Bayesian tree (with better resolution), a strongly supported clade (PP: 0.99) contains all eumetazoan Jagged sequences plus one sequence from Branchiostoma and one from the sponge Oscarella (not supported by the ML tree; Additional file 6). This suggests the existence of a subfamily of Serrate/Jagged proteins that is found in all the major animal lineages and therefore is of ancient origin. Most of the other studied proteins (32 out of 35 remaining sequences) form another large monophyletic group (although of weak support, PP: 0.55) likely corresponding to what may be called a Delta clade (Figure 7) since it includes the known Deltas from vertebrates as well as from the main metazoan lineages, including the sponge Amphimedon and the placozoan Trichoplax. Nevertheless, the internal branching of the Delta sequences makes no sense in the light of species phylogenies. Our phylogenetic analysis rather suggests that the last common ancestor of all eumetazoans already possessed at least one Delta and one Jagged/Serrate gene and that the Urmetazoa possessed at least one sequence of Delta. The position of the of D/J-Oscarella carmela in the Bayesian tree is puzzling, the BLAST analysis revealed a higher similarity between this sponge (unfortunately incomplete) sequence and Delta sequences but we cannot definitively rule out the possibility that it might be an incomplete Jagged protein.

To support our phylogenetic analyses, we also systematically investigated the domain arrangements of the DSL family proteins (Figures 8, 9). DSL proteins are usually considered to be composed of several domains, namely a signal peptide (secretion signal), a MNLL domain (a conserved region at the N terminus), a DSL domain (Delta-Serrate-Lag-2: about 50 amino acids, containing six conserved cysteines and a YYG motif), a variable number of EGF repeats and a transmembrane region. In addition to these domains, the Serrate/Jagged proteins also contain a supplementary domain, the Von Willebrand factor C domain (VWC) [57]. Interestingly, all but two proteins included in the Jagged group in our phylogenetic trees contain the VWC domain, confirming that they are bona fide Jagged proteins (Figure 9). The exceptions are the two Branchiostoma genes; phylogenetic analyses highly support their belonging to the Jagged clade, suggesting that the absence of the VWC domain may be due to incorrect protein predictions, incomplete genome assemblage or secondary loss.

Third, in our ligand domain analyses (Figures 8, 9), we found that the MNLL, the signal peptide and the transmembrane domains are not present (or detected) across all metazoan Delta ligands but we could find them in the majority of Jaggeds. Most deuterostome Delta sequences possess the MNLL domain, in contrast to the protostome sequences. Among the sponge species a MNLL is only predicted in one copy of the Amphimedon Deltas. The number of EGF repeats ranges from 0 (in the sponge Amphimedon) to 75 in Delta and from 12 to 18 in Jagged. An average of 7-8 EGF motifs are present in deuterostome Delta sequences; it is much more variable in protostomes. We note that motifs expected at the N or C terminus are more often lacking. As this absence of a signal peptide or a transmembrane region appears incongruous and hardly compatible with the conservation of functionality, the assembly and annotation of the concerned genomes may require a re-examination [58].

Surprisingly, in cnidarian genomes, in addition to the Delta and Jagged sequences, we found genes composed only of DSL domains (from 1 to 11 repeats) and one gene composed of a MNLL domain associated to 3 DSL domains (Additional file 7). It remains to be seen either



**Bayesian phylogram of Notch representative proteins**. Posterior probabilities (greater than 0.50) are indicated next to the node. The Notch families 1, 2 and 3 are presented respectively in yellow, blue and green boxes.

Page 10 of 27 (page number not for citation purposes)



**Domain arrangement of Notch proteins in metazoans**. Deuterostomes, protostomes and non-bilaterian metazoans are presented in red, blue and green respectively. Phylogenetic hypothesis based on [45,46]. See figure inset for the domain legends.

#### BMC Evolutionary Biology 2009, 9:249

#### http://www.biomedcentral.com/1471-2148/9/249



Figure 7 Bayesian phylogram of DSL representative proteins. Posterior probabilities (greater than 0.50) are indicated next to the node. In blue boxes, most of the Delta sequences split in three clades. In red box, the Jagged representatives.



**Domain arrangement of Delta proteins in metazoans**. Deuterostomes, protostomes and non-bilaterian metazoans are presented in red, blue and green respectively. Phylogenetic hypothesis based on [45,46]. See figure inset for the domain legends.

Page 13 of 27 (page number not for citation purposes)



**Domain arrangement of Jagged proteins in metazoans**. Deuterostomes, protostomes and non-bilaterian metazoans are presented in red, blue and green respectively. Phylogenetic hypothesis based on [45,46]. See figure inset for the domain legends.

these are true genes with unique functionalities, or represent misassembled regions of the genome.

# Origin and evolution of protein domains involved in the pathway

We focused on five genes that encode multidomain proteins in the pathway: DSL, Notch, Mindbomb, Su(H), Furin. We mapped the possible acquisition(s) and loss events of the different domains during eukaryote evolution according to the phylogenetic hypothesis of Baldauf (2003) [36] (Figures 10, 11, 12).

On one hand, it appears that various domains have an ancient origin; they are shared by several eukaryote lineages, so we can hypothesize their presence in the LECA (or in the ancestor of eukaryotes bearing mitochondria: all eukaryotes except discicristates and excavates). This is the case for: EGF repeats of Notch and DSL (only present in eukaryotes [59]), ANK repeats of Mindbomb and Notch (present in eukaryotes, Archaea and Bacteria); the LNR domain of Notch; both ZZ and Ring type ZN finger domains of Mindbomb; the IPT RBP-JKappa domain of Su(H); the Subtilisin domain and the Furin domain. In all of these cases, a hypothesis of ancestrality followed by one or more secondary losses is most parsimonious.

On the other hand, several domains appear to have originated more recently since they are specific to opisthokonts or even to metazoans: the MNLL, DSL and VWC domains involved in *DSL* composition; the NOD and NODP domains of Notch; the Mib/Herc2 domain of Mindbomb; the Lag1 and Beta-trefoil domains of Su(H). Thus, a total of six domains may represent synapomorphies of the Metazoa. In the case of the P-proprotein of Furin, the more parsimonious inference is that it may have appeared convergently three times in Excavata, Heterokonta and in Opistokonta (with a secondary loss in Microsporidia).

#### Discussion

A functional Notch pathway seems to have been present in the Urmetazoa and comprised at least 17 components [30]. The later addition of five other components (in Eumetazoa or Bilateria) can thus be considered as facultative and responsible for additional regulation properties of the pathway. Our study indicates that the presence of the Notch pathway is a synapomorphy of metazoans as this is the only kingdom to possess all the key components of the pathway, most importantly the receptor and ligands. Our analysis also sheds light on the molecular mechanisms that may have been invoked in the forma-



#### Figure 10

Scenarios proposed for the emergence of the constitutive domains of DSL ligands and Notch receptors during eukaryote evolution. These scenarios are inferred from our analyses on the basis of the phylogenetic hypotheses of Baldauf 2003 [36] and the application of the principle of parsimony. The left and the right halves of the figure represent the two rooting hypotheses for the eukaryotes. A line represents the appearance of a domain, a cross represents the loss of a domain. Each colour corresponds to a specific domain (see figure inset). Domain presences are summarized under each taxa.

Page 15 of 27 (page number not for citation purposes)



Scenarios proposed for the emergence of the constitutive domains of the receptor regulator Mindbomb during eukaryote evolution. These scenarios are inferred from our analyses on the basis of the phylogenetic hypotheses of Baldauf 2003 [36] and the application of the principle of parsimony. The left and the right halves of the figure represent the two rooting hypotheses for the eukaryotes. A line represents the appearance of a domain, a cross represents the loss of a domain. Each colour corresponds to a specific domain (see figure inset). Domain presences are summarized under each taxa.

tion of this pathway. Indeed, as we discuss hereafter, our study shows that Notch signalling has originated by cooption of pan-eukaryotic ancestral genes; modification of ancestral functions by new protein-protein interactions (mediated by novel metazoan domains); lateral gene transfer; formation of new proteins by both exon shuffling and duplications + divergence.

#### Cooption of pre-existing genes and ancestral functions

This study, at the scale of the Eukaryota super-kingdom, reveals the presence of Notch components in diverse eukaryotic organisms, and thus their ancient origin. Certain highly conserved genes, despite their ancestrality, seem to be absent in Fungi and Microsporidia. This is consistent with previous genomic analyses that have documented massive gene losses in the LCA of Fungi + Microsporidia, and a further round of losses in microsporidies in relation to their parasitic life style [60,61].

#### The origin of Presenilin and of the 7-secretase complex

One of the most striking features uncovered by our study is the evolutionary conservation of the y-secretase complex [22,62]: the four proteins composing this large transmembrane complex (Nicastrin, APH1, PEN2 and Presenilin [63,64]) are present in both plants and unikonts (except in Fungi + Microsporidia). While the entire y-secretase complex does not seem to be paneukaryotic, our analysis nonetheless supports an altered evolutionary scenario than that formerly proposed for its main player, Presenilin. Previously, authors have hypothesized (based on an early view of the tree of life) a convergent acquisition of this gene in the metazoan and the plant lineages [65]. Our study reveals instead that Presenilin was present in the LECA, and then lost independently twice (in the LCA of Fungi + Microsporidia and in Alveolata). The APH1 and Nicastrin proteins may also be ancestral to Eukaryota, but our data is inconclusive for PEN2 on this point (found only in Unikonta and Plantae). Until now, functional analyses of this complex are available



Scenarios proposed for the emergence of the constitutive domains of Su(H) and Furin during eukaryote evolution. These scenarios are inferred from our analyses on the basis of the phylogenetic hypotheses of Baldauf 2003 [36] and the application of the principle of parsimony. The left and the right halves of the figure represent the two rooting hypotheses for the eukaryotes. A line represents the appearance of a domain, a cross represents the loss of a domain. Each colour corresponds to a specific domain (see figure inset). Domain presences are summarized under each taxa.

only in Embryophyta [66] and Metazoa, where it is known to be involved in the cleavage of Notch and other proteins such as ErbB4 [67] and APP (amyloid precursor protein, implicated in Alzheimers disease [68]). But the lack of evidence for a complete  $\gamma$ -secretase complex in the LECA (because of the possible later emergence of PEN2) parallels recent functional data indicating that in both mammals [69] and a bryophyte (Physcomitrella patens [66]), Presenilin is also involved in various y-secretaseindependent functions such as protein degradation and trafficking. The association of PEN2 (present either in the LCA of unikonts and plants or acquired independently in these two lineages) is considered to be necessary to acquire the proteolytic activity of Presenilin via conformational changes [70]. These changes may result in the accessibility of the two catalytic motifs Y/WD and GXGD, which are conserved at the eukaryotic scale [71]. This suggests that proteolysis might not have been the ancestral function of Presenilin (alone or in association with Nicastrin [66]), but might have been acquired secondarily by its co-option into the four protein  $\gamma$ -secretase complex (including PEN2). This challenging evolutionary scenario requires further investigations to be tested.

#### The origin of the Notchless inhibitor

Notchless encodes a protein containing a NLE domain and WD40-repeats [72]. In Eumetazoa, this member of the WD-repeat (WDR) protein superfamily [73,74] modulates the Notch pathway by binding the NICD [75] but also by interacting with *Deltex* and Su(H) [72]. Our analysis shows that Notchless was probably present in LECA. Nevertheless, in some of the studied species, the NLE domain is missing, and we cannot define whether this is due to secondary loss or to a high level of sequence divergence obscuring domain prediction. The high conservation of NLE sequences seems to be compatible with functional conservation as shown by transgenic experiments between a plant, *Solanum chacoense* and an animal,

Drosophila [76,77]. However, while both plant and yeast Notchless proteins share an involvement in ribosome biogenesis, until now no such role has been reported in animals [78]. These observations have led authors to propose that either Notchless was primarily involved in ribosome biogenesis in eukaryotes and was secondarily recruited in the metazoans for a new function (regulator of Notch pathway), or that this role may still exist in animals despite the lack of experimental evidence [79].

#### Ancestrality or lateral gene transfer?

Two other members of the Notch pathway show an ambiguous history, in which the eventuality of lateral gene transfer (LGT) cannot be excluded. This is the case for both Fringe [80] and Strawberry Notch (Sno). Our analyses reveal that Fringe is present in Metazoa, but also in plants and parabasalia (Trichomonas). A fringe domain alone was also identified in the studied Ascomyceta species; however no complete Fringe or Fringe-like gene seems to be present in this taxon (data not shown). We could hypothesize that the Fringe gene was present in the LECA and then lost several times; nevertheless, the most parsimonious scenario suggests three independent acquisitions. We can speculate that LGT might have occurred, favoured by either the tight association existing between Parabasalia and Metazoa lineages or via bacterial transfers [81]. However, we failed to find any specific relationships or signatures (Additional file 2) between the Fringe genes of Homo and its parasite Trichomonas as well as we failed to detect Fringe outside Eukaryota to strongly argue for a LGT hypothesis.

In our analysis, Sno is shown to be present in Holozoa and Plantae. Unexpectedly, Sno has been reported recently in a nuclear and cytoplasmic large DNA virus (NCLDV) of the haptophyte (taxon related to Heterokonta [36]) Emiliania huxleyi [82]. As our analysis on the genomes of the two chosen heterokonts (Phytophthora sojae and ramorum) failed to reveal the presence of Sno, we chose to extend our research to other heterokonta related species. Interestingly, Sno is not only present in the genome of the haptophyte Emiliania, suggesting a LGT between this species and its virus EHV (Emiliania huxleyi virus), but also in two other heterokonta, Aureococcus anophaegefferens and Thalassiosina pseudonana (Additional file 8). Another interesting feature is that Sno has been shown to be derived from the SNF2/SWI2 ATPases encoding gene of α-proteobacteria [83]. The presence of Sno or Sno-related genes in both NCLDV and a-proteobacteria may suggest LGT events in the history of these genes because i)  $\alpha$ -proteobacteria are often found in tight associations with various eukaryote taxa (e.g: Wolbachia/Metazoa; nodosities of Fabaceae plants) and ii) NCLDVs have been reported from Amoebozoa, Haptophyta, Discicristata and Viridiplantae however their ecological distribution and importance is still

largely unknown and newly described virophage of NCLDVs may also be involved in LGT [82-84].

In the two cases (*Fringe* and *Sno*), further analyses (on more species) are needed to shed light on the origin and history of these genes and to state whether they were acquired by LGT or not.

#### The Notch pathway is specific to Metazoa

The cooption or acquisition (by LGT) of "old" genes is not sufficient to explain the formation of the canonical Notch pathway. One of the pivotal steps in the evolutionary history of the Notch pathway seems to be the transition between the choanoflagellates and the animals [85]. Indeed, this study reveals that the majority of Notch components appeared in the LCA of the Holozoa. Nevertheless, several molecular components critical for signal transduction are lacking in choanoflagellates, in particular, the ligand Delta and the receptor Notch (although we found a gene that possesses a domain arrangement similar to that of the metazoan *Notch* genes, it has very weak sequence similarity to these genes), thus we consider the Notch pathway as a synapomorphy of the Metazoa (this study, [47]).

An increase in the complexity of this pathway has also occurred after the divergence between sponges and other metazoans. Several Notch components are absent from the demosponge *Amphimedon* (Furin, Mastermind, SMRT, Numb and Neuralized), yet the pathway may still be functional in this species [30]. This suggests that these components were not critical for the function of the pathway and may constitute additional regulatory elements that were subsequently added to the pathway in eumetazoans. Nevertheless, the possible pan-metazoan ancestry of these genes (and their subsequent loss in *Amphimedon*) cannot be excluded; data from other sponges may help to resolve this issue.

The absence of Furin in Amphimedon is not really unexpected; although Furin has a critical role for the maturation of the receptor Notch in vertebrates, it has been shown in Drosophila that Furin is not essential for Notch signalling. Indeed, the Notch receptor can still be trafficked to the membrane without this initial cleavage [86]. Furin belongs to the PCSK superfamily which contains diverse families of proteases. Several PCSK proteins are present in Amphimedon although none seem to be bona fide Furins (as they do not group with bilaterian Furin in the phylogenetic tree; additional file 2). Nevertheless, we cannot exclude the possibility that one of these PCSKs may perform the S1 cleavage in the Amphimedon Notch pathway instead of Furin. Indeed, all PCSKs share the same canonical cleavage site R-X-R/K-R and (presently scarce) available functional data suggest that some of

them may play similar roles in different cellular lineages [87].

The absence of a complete Neuralized in non-bilaterians is not incompatible with a functional pathway, due to the functional redundancy of Neuralized and Mindbomb [88]: the latter being present in non-bilaterians. Indeed, these two components are both E3 ubiquitin ligases involved in ligand endocytosis and regulation [27,28,89]*via* ubiquitylation [90], and were shown to be able to rescue each other in *Drosophila* [91,92]. A functional study of the Notch pathway in Placozoa, which lacks both a complete Neuralized and Mindbomb, would allow a better understanding of the effects of the absence of E3 ubiquitin ligase regulation.

Regarding the inhibitor Numb, it inhibits Notch *via* endocytosis and regulates cell fate acquisition by asymmetric cell division or by lineage decision processes [93-95]. Functional studies in sponges would be necessary to state whether another protein replaces Numb function. Nonetheless, it appears that the mechanism of Numb-mediated asymmetric cell fate acquisition is a synapomorphy of Notch pathway activity in Bilateria.

The co-activator Mastermind (MAM) is classically considered an integral part of the co-activation complex. Its non critical nature is highly unexpected and its absence from the demosponge species, as well as several bilaterian species, is puzzling. The high sequence divergence of the MAM proteins in bilaterians (MAM proteins share little sequence similarity apart from the N-terminal region [23], the region which interacts with Su(H) and NICD [96]) could make searching for them by sequence similarity alone inconclusive. Alternatively, these proteins may have been secondarily lost in several species, indicating that MAM proteins may be facultative for pathway function or replaceable by other proteins. In the absence of functional data on species that apparently lack MAM, we cannot distinguish between these two hypotheses.

# Recent acquisition of new functions: intervention of domain shuffling

It is clear from our data that novelty arose either in the LCA of Holozoa or in the metazoan stem lineage, which resulted in the assembly of disparate components into the functional Notch signal transduction pathway in animals. Our study further enables us to partly understand the molecular evolutionary mechanisms that may have facilitated these events.

Hereafter, we focus on the origin of the two main players, the receptor Notch and the ligands Delta-Jagged, all of which are metazoan specific multidomain proteins.

#### The origin and evolution of Notch

In the light of the recent data concerning sponges [30] and the present study, we can infer that Notch is a synapomorphy of Metazoa and consists of 3 core protein domains: EGF, ANK and LNR. Interestingly, these 3 domains exist in all eukaryotes. Proteins composed of EGF domains, LNR domains or ANK domains have been reported on separate chromosomes in M. brevicollis [47]. It has been proposed that the presence of these domains in separate Monosiga proteins suggests that Notch is the result of a new recombination of existing domains, known as exon or domain shuffling [97,98]. Data concerning the role of the LNR domains also found in the pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A) are too scarce to infer the ancestral function of this domain [99]. The only common feature that we can note between the LNR domains of Notch and PAPP-A is a calcium binding capability [100]. In contrast, EGF and ANK are modular protein subunits, that are very common in eukaryote proteins and that are known to be involved in protein-protein interactions [101]. The ANK repeat is one of the most common protein-protein interaction motifs in living beings [102,103]. It has been primarily reported in eukaryotes, although examples from prokaryotes and viruses are also known and may be the result of lateral gene transfer [104]. ANK domains are not only part of the composition of Notch (3 to 5 ANK repeats) but also of Mindbomb (1 to 6). The ANK repeat is a relatively well conserved motif with strongly conserved residues (a Thr-Pro-Leu-His tetrapeptide motif and Val/Ile-Val-X-Leu/Val-Leu-Leu motif) and 2 α-helices [103]. We note that the Mindbomb ANK motifs are less well conserved than the Notch ANKs, suggesting that the structural integrity of the ANK motifs of Mindbomb are less constrained than in Notch. ANK motifs in Notch have a crucial role; they are involved in the assembly and stability of the complex with Su(H) and Mastermind [105,106]. When ANKs are deleted, the Notch signalling pathway is not functional in mice [105]. Mindbomb ANK repeats are important for the Delta internalization process but are not necessary for Delta ubiquitination [107]. As already mentioned, Mindbomb can be functionally replaced by Neuralized; this flexibility may have led to weaker evolutionary constraints on the Mindbomb ANK repeats than on those of Notch.

The two enigmatic domains NOD and NODP, the roles of which are still unknown, seem to be an innovation of Eumetazoa. Our analysis does not allow us to infer the process by which they appeared.

#### The origin of DSL proteins: Delta and Jagged

Notch has two possible ligands encoded by the two paralogous genes *Delta* and *Jagged*. Our analyses show that *Delta* was ancestrally present in Metazoa, while a complete *Jagged* is absent from Placozoa and Porifera. Phylo-

Page 19 of 27 (page number not for citation purposes)

genetic analyses of the ligands do not provide conclusive results. As already mentioned, we can envisage that the ligands are evolving in a rapid and divergent way in each lineage, and this could cause the loss of ancient phylogenetic signals.

Experimental data suggest that Delta and Jagged may be complementary, functionally interchangeable or antagonistic [108,109]. They share two protein domains, MNLL and DSL, associated with the EGF repeats that they have in common with Notch, and are directly involved in receptor/ligands interactions. While EGF repeats represent an ancient domain, as previously discussed, MNLL and DSL domains are absent outside Metazoa. Their origin cannot be clarified by our study. Nevertheless, we may speculate that the DSL domain shares ancestry with the LNR domains of the Notch receptor. Indeed, comparison of cysteine patterns from these two domains revealed that, for 4 of the 6 cysteines, positions and spacing are conserved.

Despite the common characteristics of Delta and Jagged, they differ by two main features: i) a VWC domain present in Jagged and absent in Delta, the function of which is not clear but it may be involved in protein complex formation; ii) the number and spacing of EGF repeats differ between Delta and Jagged (an average of 7 and 14 respectively). Nevertheless, no correlation between the number of EGF repeats in the ligand and the affinity to the Notch receptor has been reported. Instead, Notch ligand choice is modulated by other proteins such as Fringe and O-fucosyltransferase that modify Notch EGF residues [110].

It is worth noting that the sponges and the placozoan possess complete *Delta* genes (with or without MNLL domains) but *Jagged* genes seem to be absent. Nevertheless, in the case of the sponges (*Amphimedon* and *Oscarella*) and of *Trichoplax*, the VWC domain, (the specific domain of Jagged) is indeed present in the genomes, but it is never found in association with a DSL domain (data not shown). Intriguingly though, in *Trichoplax*, the VWC domain is found in association with EGF domains (7). These observations lead us to propose two possible evolutionary scenarios for the Notch ligands (Figure 13):

- An ancestral *Delta* gene duplicated before the radiation of the Eumetazoa, followed by an association of the VWC domain to one of these *Delta* copies. The number of EGFs increased either by tandem duplications within a gene (where a segment is duplicated and the copy inserted next to its origin), exon shuffling (which may be responsible for internal duplications of repeats) or DNA slippage (due to the formation of DNA hairpins) [98,111]. - An ancestral Delta gene duplicated before the radiation of the Eumetazoa, at which time EGF repeats were already independently associated with a VWC domain (the state observed in Placozoa). One copy of the ancestral Delta joined the EGF+VWC motif to create Jagged. This second hypothesis could explain the higher number of EGFs in Jagged compared to Delta (as the result of the addition of two series of EGF repeats). The fact that EGF motifs from Jagged seems to be physically separated into two groups, as shown in Figure 9, may support this hypothesis. This second scenario is also convincing because the shared possession of motif repeats (EGFs) between independent genes was previously reported to favour domain shuffling (non homologous recombination) with likely consequences the creation of new exon combinations and thus new proteins [97,111].

As we failed to find any specific signature in EGF repeats that could allow us to favour one of these two scenarios, the sequencing of additional non-bilaterian genomes may help to resolve this question. Nevertheless we have to keep mind that currently the placozoan phylogenetic position is still controversial [44,45,112,113].

#### Conclusion

This study focusing on the Notch signalling pathway provides for the first time a complete description of Notch components and auxiliary factors across the Eukaryota. These investigations have enabled us to re-assess the ancient origin of some components such as the  $\gamma$ -secretase complex and *Notchless. Fringe* and *Sno* are probably old genes that were convergently acquired by lateral gene transfer. Several new functions of the Notch pathway likely originated in the last common ancestor of Holozoa, which already possessed 12 genes of the pathway. Nevertheless, the core genes needed for a functional pathway are only present in metazoans and it apparent that the two main players, *Notch* and *Delta*, emerged *via* both the shuffling of old domains (EGF, ANK, LNR), and the invention of new ones (MNLL, DSL).

At present, functional data on non-bilaterian models are scarce, but such efforts need to be realized in order to understand the emergence of functionality in the Notch pathway. More largely this will pertain to an understanding of the emergence of signal transduction pathways during the acquisition of multicellularity in the Metazoa.

#### Methods

#### Data sources and sequence retrieving

Genomic data (including 31 complete genomes) were used when available. If not, EST trace files were scanned instead; as was the case for four species: Oscarella carmela



Alternative scenarios concerning the evolution of the DSL ligands (Delta, Serrate and Jagged) in Metazoa, based on the phylogenetic hypothesis of [46]. The EGF+VWC association found in the genome of *Trichoplax* may be considered either as specific to the placozoan lineage (scenario I) or as an intermediate step involved in the subsequent formation of Jagged/Serrate (scenario II). Domains are represented in different colours as indicated in the figure inset (signal peptide and transmembrane domain are excluded for clarity of presentation). Red and green lines indicate proposed occurrence period of the events.

(Porifera), *Pleurobrachia pileus* (Ctenophora), *Mnemiopsis leidyi* (Ctenophora) and *Bigelowiella natans* (Rhizaria). As the *Amphimedon queenslandica* genome is still not annotated, sequences were identified and concatenated following the previously published procedure [85,114].

Regardless of the origin of the sequence data, TBLASTN or BLASTP searches [38] were carried out on genome data (including 31 complete genomes) when available with a cut-off E-value threshold of  $e^{-25}$  or less. When BLASTs against genome data gave results, the sequences obtained were systematically reciprocally BLASTed against the NCBI database. In this way, we could confirm the validity of the sequences retrieved with the initial BLAST searches (reciprocal best hits [115]).

#### Sequences analyses

Genes were scored "present", "absent" or "incomplete" (Figure 3). Genes were annotated "incomplete" when the domain composition considered as diagnostic was not recovered (for details see Table 2 and procedure for domain arrangement analysis hereafter) Genes were scored as "absent" only when BLAST searches against a complete genome gave no result. Abbreviations for species names are as follows: *Aae: Aedes aegypti; Aqu: Amphimedon queenslandica; Ath: Arabidopsis thaliana; Bfl: Branchiostoma floridae; Bna: Bigelowiella natan; Cel: Caenorhabditis elegans; Cin: Ciona intestinalis; Ddi:Dictyostelium discoidum; Dre: Danio rerio; Ecu: Encephalitozoon cuniculi; Ehi: Entamoeba histolytica; Gga: Gallus gallus; Hma: Hydra magnipapillata; Hro: Helobdella robusta; Hsa: Homo sapiens; Lgi: Lottia gigantea; Lma: Leishmania major, Mbr:*  Monosiga brevicolis; Mle: Mnemiopsis leidyi; Ngr: Naegleria gruberi; Nve: Nematostella vectensis; Oca: Oscarella carmela; Pfa: Plasmodium falciparum; Ppi: Pleurobrachia pileus; Pra: Phytophthora ramorum; Pso: Phytophthora sojae; Sce: Saccharomyces cerevisiae; Spo: Schizosaccharomyces pombe; Spu: Strongylocentrotus purpuratus; Tad: Trichoplax adherens; Tth: Tetrahymena thermophila; Tva: Trichomonas vaginalis; Uma: Ustilago maydis; Vca: Volvox carteri; Xtr: Xenopus tropicalis;

For phylogenetic analyses, 18 alignments (one alignment for each gene except for *O-fut, SMRT* and *HES*, the latter having been recently reported in [116]) were performed using the online software Muscle (<u>http://www.ebi.ac.uk/</u><u>Tools/muscle/index.html</u>[117,118]) and subsequently corrected by eye in Bioedit Sequence Alignment Editor 5.09 [119] (additional file 1). The alignments were then treated with the program GBLOCKS with the least-stringent settings to release positions of uncertain homology [120].

For Notch and DSL proteins, the number of EGF domains is variable so they were excluded from the phylogenetic analyses. For the analysis of Notch, the alignment used includes only a part of the sequence from LNR domain to the end (749 bp). The DSL alignment used includes also partially the DSL protein sequence from the beginning to the end of the DSL domain (169 bp). Five sequences were incomplete in the DSL alignment (Delta: O. carmela; S. purpuratus 3; Jagged: L. gigantea 2; H. robusta; B. floridae). For ligand nomenclature, all genes that contain the VWC domain were named Jagged (prefixed with J-).

Phylogenetic trees were constructed from the protein alignments using the maximum likelihood method (ML) with the PHYML program under a WAG model of amino acid substitution [121]. To take into account rate variation among sites, we computed likelihood values by using an estimated gamma law with four substitution rate categories and we let the program evaluate the proportion of invariant sites (WAG+I+ $\Gamma$ 4). Node robustness was tested by bootstrap (BP) analysis [122] with 1,000 replicates. In addition, for DSL and Notch phylogenetic analyses, Bayesian analysis was performed with MrBayes 3.1, using the WAG fixed model [123]. Two sets of six independent simultaneous metropolis-couples Markov chains Monte Carlo were run for five million generations and sampled every hundredth generation. The runs were monitored for convergence and an adequate burn-in was removed (above 25% of tree and parameters). Bayesian posterior probabilities (PP) were used for assessing the confidence value of each node [124].

#### Domain arrangements and composition

For multidomain protein coding genes, the presence of specific protein domains and the domain arrangements

were checked by scanning sequences with Prosite <u>http://www.expasy.org/prosite/[125]</u>, CDD <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml[126]</u> and InterProscan <u>http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/</u> online software [127].

In addition, for *Notch*, *Delta* and *Jagged* genes we used PSORTII [128] and PESTfind [129] software for identifying the nuclear localisation signal (NLS) and the PEST region respectively. For other regions and/or domains characteristic of the Notch receptors and Delta ligand that cannot be detected by the previous software (C-C linker, RAM motif, cleavage sites) conserved regions were identified "by eye" on the basis of sequence alignments and previous works [19,62,96,130]. It is worth noting that the prediction of cleavage sites was confounded by sequence divergence, such that these sites cannot always be stated with full confidence. For designing the Notch, Delta and Jagged compositions, MyDomains Image Creator from Prosite was used.

Five major genes of the Notch pathway were selected for more detailed domain composition analyses: the receptor Notch, the ligand DSL, Suppressor of Hairless, the ligand regulator Mindbomb and the enzyme responsible for the S1 cleavage, Furin. We used multiple software platforms for gene domain prediction (Prosite, Interproscan, SMART [131,132], Pfam [133], Superfamily (supfam.org/ SUPERFAMILY/) [134]). Evolution of these five genes among eukaryotes was discussed according to two previously proposed rooting hypotheses [36,135]. Two conflicting hypotheses for the position of the root of the eukaryote tree are currently recognized [36,136]: subdivision of eukaryotes between opisthokonts + amoebozoans and bikonts (all remaining eukaryotes, on the left of Figures 10, 11, 12) [135], and the more classical rooting on excavates (on the right of Figures 10, 11, 12) [137,138].

#### List of abbreviations

ADAM: A Disintegrin and Metalloprotease; APH1: Anterior PHarynx defective 1; APP: Amyloid Precursor Protein; ANK: Ankyrin; BI: Bayesian Inference; BLAST: Basic Local Alignment Search Tool; BP: Bootstrap; CA: Common Ancestor; CBF1: C-Repeat/Dre Binding Factor 1; CDD: Conserved Domain Database; CSL: CBF1, Su(H), Lag-1; DSL: Delta Serrate Lag-2; EGF: Epidermal Growth Factor; EHV: Emiliana huxleyi Virus; ErbB4: Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4; E(Spl): Enhancer of Split; EST: Expressed Sequence Tag; HAC: Histone ACetylase; HDAC: Histone DeACetylase; HECT: Homologous to the E6-Ap Carboxyl Terminus; Herc2: Hect domain and RLD 2; HES: Hairy/Enhancer of Split; HEY: Hairy/Enhancer of split related with YRPW motif 1; IPT RBP-J Kappa: Recombination signal Binding Protein for Immunoglobulin kappa J region; LBA: Long Branch Artefact; LCA: Last Common Ancestor; LECA: Last Eukaryote Common Ancestor; LGT: Lateral Gene Transfer; LNR: Lin12/Notch repeats; LUCA: Last Universal Common Ancestor; MAM: Mastermind; Mib: Mindbomb; ML: Maximum Likelihood; NCBI: National Center for Biotechnology Information; Ncor: Nuclear receptor corepressor; NCLDVs: Nuclear and Cytoplasmic DNA virus; NECD: Notch Extracellular Domain; NEDD4: Neuronal precursor cell-Expressed Developmentally, Downregulated 4; NICD: Notch Intracellular Domain; Nle: Notchless; NLS: Nuclear Localization Signal; O-fut: O-fucosyltransferase; PEN2: Presenilin Enhancer 2; PHYML: Phylogenies by Maximum Likelihood; PP: Posterior Probabilities; RTK: Receptor Tyrosine Kinase; SMART: Simple Modular Architecture Research Tool; SMRT: Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid receptors; Sno: Strawberry notch; Su(dx): Suppressor of Deltex; Su(H): Suppressor of Hairless; TGF-B: Transforming Growth Factor β; VWC: Von Willebrand Factor type C; WAG: Whelan and Goldman.

#### Authors' contributions

EG, FB, GR, PL, and BDM retrieved the sequences used in the study. EG, GR, and PL made the sequence alignments and performed the phylogenetic analyses. EG and GR performed domain analyses. EG, ER, AEV and CB conceived the study. EG, ER and MV designed and coordinated the study. EG, ER, CB and MV drafted the manuscript and all authors participated in the editing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Additional material

#### Additional file 1

Alignments used for the phylogenetic analyses. The data provided represent the alignments used for the 18 phylogenetic analyses. Click here for file

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2148-9-249-S1.DOC]

#### Additional file 2

**Phylogenetic analyses.** In this file we provide the phylogenetic trees constructed from the protein alignments using the maximum likelihood method (ML) with the PHYML program for 16 Notch components (excepted Notch and Delta/Jagged). Click here for file

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2148-9-249-S2.PDF]

#### Additional file 3

**Diagnostic domains table.** In this table we report the presence or absence of the domains that compose each protein in all species. Click here for file

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2148-9-249-S3.DOC]

#### Additional file 4

"Notch-like" in Monosiga brevicollis. The sequence of Monosiga brevicollis presenting a domain arrangement of a Notch gene is provided. Click here for file [http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/14/1-2148-9-249-84.DOC]

#### Additional file 5

Notch phylogenetic tree. Notch phylogenetic tree constructed from the protein alignments using the maximum likelihood method (ML) with the PHYML program. Click here for file

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2148-9-249-S5.PDF]

#### Additional file 6

DSL phylogenetic tree. DSL proteins phylogenetic tree constructed from the protein alignments using the maximum likelihood method (ML) with the PHYML program. Click here for file [http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2148-9-249-S6.PDF]

#### Additional file 7

Unusual arrangement of DSL domains in Nematostella vectensis. In this file we report the sequences of Nematostella vectensis presenting an unusual arrangement of DSL domains. Click here for file [http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2148-9-249-S7.DOC]

#### Additional file 8

Strawberry notch sequences. In this file we report the Strawberry notch sequences identified in two heterokonts. Click here for file [http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2148-9-249-S8.DOC]

#### Acknowledgements

We are extremely grateful to the Department of Energy (DoE) Joint Genome Institute for sequencing the genomes of the different species used in this study and for making these sequences publicly available. We are also very grateful to Pr M. Manuel for providing us *Pleurobrachia pileus* sequences, Ajna Rivera and David Weisblat for some *Helobdella robusta* sequences, Romain Derelle for his help and advices, Pr Jean-Nicolas Volff for hosting E.G. in his lab and Dr. Jean Vacelet for his advices. Our work has been supported by the Marine genomics Europe network through the GAP Fellowship (to E.G. Project no.GOCE-CT-2004-505403) E.G. and P.L. hold a fellowship from the Ministère Français de la Recherche. B.M.D is supported by grants from the Australian Research Council.

#### References

 King N: The unicellular ancestry of animal development. Dev Cell 2004, 7:313-325.

- 2. Müller WE: Review: How was metazoan threshold crossed? The hypothetical Urmetazoa. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2001, **129:**433-460. Müller WE, Thakur NL, Ushijima H, Thakur AN, Krasko A, Le Pennec
- 3. G, Indap MM, Perovic-Ottstadt S, Schroder HC, Lang G, Bringmann G: Matrix-mediated canal formation in primmorphs from the sponge Suberites domuncula involves the expression of a
- CD36 receptor-ligand system. J Cell Sci 2004, 117:2579-2590. Pires-daSilva A, Sommer RJ: The evolution of signalling pathways in animal development. Nat Rev Genet 2003, 4:39-49. 4.
- opment. Teratology 1999, 60:226-239. 5.
- Barolo S, Posakony JW: Three habits of highly effective signal-6. ing pathways: principles of transcriptional control by devel-opmental cell signaling. Genes Dev 2002, 16:1167-1181. Greenwald I: LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and
- 7. flies. Genes Dev 1998, 12:1751-1762.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ: Notch signaling: cell fate 8. control and signal integration in development. Science 1999, 284:770-776.
- 9 Mumm JS, Kopan R: Notch signaling: from the outside in. Dev Biol 2000, 228:151-165.
- Baron M: An overview of the Notch signalling pathway. Cell & 10. Developmental Biology 2003, 14:113-119.
- II.
- Kadesch T: Notch signaling: a dance of proteins changing part-ners. Exp Cell Res 2000, 260:1-8. Kadesch T: Notch signaling: the demise of elegant simplicity. Curr Opin Genet Dev 2004, 14:506-512. 12.
- 13. Schweisguth F: Regulation of notch signaling activity. Curr Biol 2004, 14:R129-138.
- Ehebauer M, Hayward P, Martinez-Arias A: Notch signaling path-14. way. Sci STKE 2006, 2006:1-4. Ehebauer M, Hayward P, Arias AM: Notch, a universal arbiter of
- 15. cell fate decisions. Science 2006, 314:1414-1415
- Radtke F, Schweisguth F, Pear W: The Notch 'gospel'. EMBO Rep 16. 2005. 6:1120-1125.
- 17. Wharton KA, Johansen KM, Xu T, Artavanis-Tsakonas S: Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* 1985, **43**:567-581.
- Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S: Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 1997, **90:**281-291.
- Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israel A: A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. Mol Cell 2000, 5:207-216. Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ,
- 20. Ray WJ, Kopan R: A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. Mol Cell 2000, 5:197-206.
- 21. Lieber T, Kidd S, Young MW: kuzbanian-mediated cleavage of Drosophila Notch. Genes Dev 2002, 16:209-221.
- Fortini ME: Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 2002, 3:673-684. 22
- 23. Bray SJ: Notch signalling: a simple pathway becomes complex. Nat Rev Mol Cell Biol 2006, 7:678-689.
- Cornell M, Evans DA, Mann R, Fostier M, Flasza M, Monthatong M, Artavanis-Tsakonas S, Baron M: The Drosophila melanogaster Suppressor of deltex gene, a regulator of the Notch receptor signaling pathway, is an E3 class ubiquitin ligase. Genetics 1999, 152:567-576. 24.
- 25. Xu T, Artavanis-Tsakonas S: deltex, a locus interacting with the neurogenic genes, Notch, Delta and mastermind in Drosophila melanogaster. Genetics 1990, 126:665-677.
- Coyle-Thompson CA, Banerjee U: The strawberry notch gene 26. functions with Notch in common developmental pathways. Development 1993, 119:377-395
- 27. Lai EC, Rubin GM: Neuralized is essential for a subset of Notch pathway-dependent cell fate decisions during Drosophila eye development. Proc Natl Acad Sci USA 2001, 98:5637-5642
- Itoh M, Kim CH, Palardy G, Oda T, Jiang YJ, Maust D, Yeo SY, Lorick K, Wright GJ, Ariza-McNaughton L, et al.: **Mind bomb is a ubiqui**tin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. Dev Cell 2003, 4:67-82.

- Kasbauer T, Towb P, Alexandrova O, David CN, Dall'armi E, Staudigl 29. A, Stiening B, Bottger A: The Notch signaling pathway in the cnidarian Hydra. Dev Biol 2007, 303:376-390. Richards GS, Simionato E, Perron M, Adamska M, Vervoort M, Deg-
- 30. nan BM: Sponge genes provide new insight into the evolution-ary origin of the neurogenic circuit. Curr Biol 2008, 18:1156-1161. Curr Biol 2008,
- Adamska M, Matus DQ, Adamski M, Green K, Rokhsar DS, Martin-dale MQ, Degnan BM: The evolutionary origin of hedgehog pro-teins. *Curr Biol* 2007, 17:R836-837. Adamska M, Degnan SM, Green KM, Adamski M, Craigie A, Larroux C, Degnan BM: Wht and TGF-beta expression in the sponge 31.
- 32. Amphimedon queenslandica and the origin of metazoan
- embryonic patterning. *PLoS ONE* 2007, **2**:e1031. Burglin TR: Evolution of hedgehog and hedgehog-related genes, their origin from Hog proteins in ancestral eukaryo-33. tes and discovery of a novel Hint motif. BMC Genomics 2008, 9:127.
- 34. Gauthier M, Degnan BM: The transcription factor NF-kappaB in the demosponge Amphimedon queenslandica: insights on the evolutionary origin of the Rel homology domain. Dev Genes Evol 2008, 218:23-32.
- Huminiecki L, Goldovsky L, Freilich S, Moustakas A, Ouzounis C, Heldin CH: Emergence, development and diversification of the TGF-beta signalling pathway within the animal kingdom. BMC Evol Biol 2009, 9:28.
- Baldauf SL: The deep roots of eukaryotes. Science 2003, 36. 300:1703-1706.
- 37. Snell EA, Brooke NM, Taylor WR, Casane D, Philippe H, Holland PW: An unusual choanoflagellate protein released by Hedgehog autocatalytic processing. Proc Biol Sci 2006, 273:401-407. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990, 215:403-410.
- 38
- Katada T, Kinoshita T: XMam I, the Xenopus homologue of mas-39. termind, is essential to primary neurogenesis in Xenopus lae-vis embryos. Int J Dev Biol 2003, 47:397-404. Yedvobnick B, Kumar A, Chaudhury P, Opraseuth J, Mortimer N, Bhat KM: Differential effects of Drosophila mastermind on
- 40. asymmetric cell fate specification and neuroblast formation. Genetics 2004, 166:1281-1289.
- Petcherski AG, Kimble J: Mastermind is a putative activator for Notch. *Curr Biol* 2000, 10:R471-473. Gagnon J, Mayne J, Mbikay M, Woulfe J, Chretien M: Expression of 41.
- 42 Seguration J, Harrie J, Honay TF, Honay TF, Charles HT, Expression of PCSK1 (PC1/3), PCSK2 (PC2) and PCSK3 (furin) in mouse small intestine. Regul Pept 2009, 152:54-60.
- 43. Borchiellini C, Manuel M, Alivon E, Boury-Esnault N, Vacelet J, Le Parco Y: Sponge paraphyly and the origin of Metazoa. J Evol Biol 2001, 14:171-179.
- Schierwater B, Eitel M, Jakob W, Osigus HJ, Hadrys H, Dellaporta SL, 44. Kolokotronis SO, Desalle R: Concatenated analysis sheds light on early metazoan evolution and fuels a modern "urmetazoon" hypothesis. PLoS Biol 2009, 7:e20.
- Srivastava M. Begovic E. Chapman J. Putnam NH, Hellsten U. Kawashima T, Kuo A, Mitros T, Salamov A, Carpenter ML, et al.: **The** 45. Trichoplax genome and the nature of placozoans. Nature 2008, 454:955-960.
- Philippe H, Derelle R, Lopez P, Pick K, Borchiellini C, Boury-Esnault 46. N, Vacelet J, Renard E, Houliston E, Queinnec E, et al.: Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships. Curr Biol 2009, 19:706-712.
- King N, Westbrook MJ, Young SL, Kuo A, Abedin M, Chapman J, Fair-clough S, Hellsten U, Isogai Y, Letunic I, et al.: The genome of the 47. choanoflagellate Monosiga brevicollis and the origin of meta-zoans. Nature 2008, 451:783-788.
- Prevorovsky M, Puta F, Folk P: Fungal CSL transcription factors. 48. BMC Genomics 2007, 8:233.
- Lavens SE, Rovira-Graells N, Birch M, Tuckwell D: ADAMs are present in fungi: identification of two novel ADAM genes in Aspergillus fumigatus. FEMS Microbiol Lett 2005, 248:23-30. Rasmussen SL, Holland LZ, Schubert M, Beaster-Jones L, Holland ND:
- 50. Amphioxus AmphiDelta: evolution of Delta protein structure, segmentation, and neurogenesis. Genesis 2007. 45:113-122.
- 51. Rao PK, Dorsch M, Chickering T, Zheng G, Jiang C, Goodearl A, Kadesch T, McCarthy S: Isolation and characterization of the notch ligand delta4. Exp Cell Res 2000, 260:379-386.

Page 24 of 27 (page number not for citation purposes)

- 52. Dove H, Stollewerk A: Comparative analysis of neurogenesis in the myriapod Glomeris marginata (Diplopoda) suggests more similarities to chelicerates than to insects. Development 2003, 130:2161-2171.
- Mar JC, Harlow TJ, Ragan MA: Bayesian and maximum likeli-hood phylogenetic analyses of protein sequence data under 53. relative branch-length differences and model violation. BMC Evol Biol 2005, 5:8.
- 54. Kolaczkowski B, Thornton JW: Effects of branch length uncertainty on Bayesian posterior probabilities for phylogenetic hypotheses. Mol Biol Evol 2007, 24:2108-2118.
- Meyer A, Schartl M: Gene and genome duplications in verte-55. brates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. Curr Opin Cell Biol 1999, 11:699-704.
- Thamm K, Seaver EC: Notch signaling during larval and juvenile development in the polychaete annelid Capitella sp. I. Dev 56. Biol 2008, 320:304-318.
- 57. Satou Y, Sasakura Y, Yamada L, Imai KS, Satoh N, Degnan B: A genomewide survey of developmentally relevant genes in Ciona intestinalis. V. Genes for receptor tyrosine kinase path-way and Notch signaling pathway. Dev Genes Evol 2003, 213:254-263.
- Phillippy AM, Schatz MC, Pop M: Genome assembly forensics: 58. finding the elusive mis-assembly. *Genome Biol* 2008, 9:R55. Ponting CP, Aravind L, Schultz J, Bork P, Koonin EV: **Eukaryotic sig**-
- 59. nalling domain homologues in archaea and bacteria. Ancient ancestry and horizontal gene transfer. J Mol Biol 1999, 289:729-745.
- Aravind L, Watanabe H, Lipman DJ, Koonin EV: Lineage-specific 60. loss and divergence of functionally linked genes in eukaryo-tes. Proc Natl Acad Sci 2000, 97:11319-11324.
- Krylov DM, Wolf YI, Rogozin IB, Koonin EV: Gene loss, protein sequence divergence, gene dispensability, expression level, 61. and interactivity are correlated in eukaryotic evolution. Genome Res 2003, 13:2229-2235.
- Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R: Notch-I signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. Nature 1998, **393:**382-386.
- Francis R, McGrath G, Zhang J, Ruddy DA, Sym M, Apfeld J, Nicoll M, Maxwell M, Hai B, Ellis MC, et al.: *oph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 2002, 63. 3:85-97
- Tandon A, Fraser P: The presenilins. Genome Biol 2002, 64. 3:reviews3014.
- 65. Hashimoto-Gotoh T, Tsujimura A, Watanabe Y, Iwabe N, Miyata T, Tabira T: A unifying model for functional difference and redundancy of presenilin-1 and -2 in cell apoptosis and differ-entiation. Gene 2003, 323:115-123. Khandelwal A, Chandu D, Roe CM, Kopan R, Quatrano RS: Moon-
- 66. lighting activity of presenilin in plants is independent of gamma-secretase and evolutionarily conserved. Proc Natl Acad Sci 2007, 104:13337-13342.
- Lee HJ, Jung KM, Huang YZ, Bennett LB, Lee JS, Mei L, Kim TW: Presenilin-dependent gamma-secretase-like intramem-brane cleavage of ErbB4. J Biol Chem 2002, 277:6318-6323. Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH: Natural oligomers of the amyloid-beta 67
- protein specifically disrupt cognitive function. Nat Neurosci 2005, 8:79-84.
- Raemaekers T, Esselens C, Annaert W: Presenilin 1: more than 69 just gamma-secretase. Biochem Soc Trans 2005, 33:559-562.
- Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi 70. Y, Thinakaran G, Iwatsubo T: The role of presenilin cofactors in
- the gamma-secretase complex. Nature 2003, 422:438-441. Spasic D, Annaert W: Building gamma-secretase: the bits and pieces. J Cell Sci 2008, 121:413-420. Royet J, Bouwmeester T, Cohen SM: Notchless encodes a novel 71.
- WD40-repeat-containing protein that modulates Notch sig-naling activity. Embo J 1998, 17:7351-7360. Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF: The ancient regu-latory-protein family of WD-repeat proteins. Nature 1994, 371:297-300. 73.
- 74. van Nocker S, Ludwig P: The WD-repeat protein superfamily in Arabidopsis: conservation and divergence in structure and function. BMC Genomics 2003, 4:50.

- 75. Cormier S, Le Bras S, Souilhol C, Vandormael-Pournin S, Durand B, Babinet C, Baldacci P, Cohen-Tannoudji M: The murine ortholog of notchless, a direct regulator of the notch pathway in Dro sophila melanogaster, is essential for survival of inner cell mass cells. *Mol Cell Biol* 2006, **26**:3541-3549. Chantha SC, Matton DP: **Underexpression of the plant NOTCH**-
- 76. LESS gene, encoding a WD-repeat protein, causes pleitropic phenotype de 225:1107-1120. during plant development. Planta 2007.
- Chantha SC, Emerald BS, Matton DP: Characterization of the plant Notchless homolog, a WD repeat protein involved in seed development. *Plant Mol Biol* 2006, 62:897-912. 77.
- Brown SJ, Cole MD, Erives AJ: Evolution of the holozoan ribosome biogenesis regulon. BMC Genomics 2008, 9:442
- Chantha SC, Tebbji F, Matton DP: From the Notch Signaling Pathway to Ribosome Biogenesis. Plant Signaling & Behavior 2007, 2:168-170.
- 80. Irvine KD, Wieschaus E: fringe, a boundary-specific signaling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during Drosophila wing development. Cell 1994. 79:595-606
- de Koning AP, Brinkman FS, Jones SJ, Keeling PJ: Lateral gene transfer and metabolic adaptation in the human parasite Tri-81. chomonas vaginalis. Mol Biol Evol 2000, 17:1769-1773.
- lyer LM, Balaji S, Koonin EV, Aravind L: Evolutionary genomics of 82. nucleo-cytoplasmic large DNA viruses. Virus Res 2006. 117:156-184
- Aravind L, Anantharaman V, Iyer LM: Evolutionary connections between bacterial and eukaryotic signaling systems: a genomic perspective. *Curr Opin Microbiol* 2003, 6:490-497. Ghedin E, Claverie JM: Mimivirus relatives in the Sargasso sea. 83.
- 84. Virol J 2005, 2:62. Larroux C, Luke GN, Koopman P, Rokhsar DS, Shimeld SM, Degnan
- 85. BM: Genesis and expansion of metazoan transcription factor gene classes. *Mol Biol Evol* 2008, **25**:980-996.
- Kild S, Lieber T: Furin cleavage is not a requirement for Dro-sophila Notch function. Mech Dev 2002, 115:41-51. Bertrand S, Camasses A, Paris M, Holland ND, Escriva H: Phyloge-86.
- 87. netic analysis of Amphioxus genes of the proprotein conver-tase family, including aPC6C, a marker of epithelial fusions during embryology. Int J Biol Sci 2006, 2:125-132. Le Borgne R, Remaud S, Hamel S, Schweisguth F: Two distinct E3
- 88. ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of delta and serrate signaling in Drosophila. PLoS Biol 2005. 3:e96
- 89. Chitnis A: Why is delta endocytosis required for effective activation of notch? Dev Dyn 2006, 235:886-894.
- 90. Le Borgne R, Bardin A, Schweisguth F: The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. Development 2005, 132:1751-1762.
- Pitsouli C, Delidakis C: The interplay between DSL proteins and ubiquitin ligases in Notch signaling. Development 2005, 91. 132:4041-4050.
- Lai EC, Roegiers F, Qin X, Jan YN, Rubin GM: The ubiquitin ligase Drosophila Mind bomb promotes Notch signaling by regulat-ing the localization and activity of Serrate and Delta. Devel-92. opment 2005, 132:2319-2332.
- McGill MA, McGlade CJ: Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. J Biol Chem 2003, 278:23196-23203.
- Tang H, Rompani SB, Atkins JB, Zhou Y, Osterwalder T, Zhong W: Numb proteins specify asymmetric cell fates via an endocy-tosis- and proteasome-independent pathway. Mol Cell Biol 2005, 25:2899-2909.
- Frise E, Knoblich JA, Younger-Shepherd S, Jan LY, Jan YN: The Dro-sophila Numb protein inhibits signaling of the Notch recep-95. tor during cell-cell interaction in sensory organ lineage. Proc Natl Acad Sci 1996, 93:11925-11932.
- Wilson JJ, Kovall RA: Crystal structure of the CSL-Notch-Mas-96. termind ternary complex bound to DNA. Cell 2006. 124:985-996.
- 97. Patthy L: Genome evolution and the evolution of exon-shuffling -- a review. Gene 1999, 238:103-114.
- 98. Long M: Evolution of novel genes. Curr Opin Genet Dev 2001, 11:673-680.

Page 25 of 27 (page number not for citation purposes)

- Sanchez-Irizarry C, Carpenter AC, Weng AP, Pear WS, Aster JC, 99. Blacklow SC: Notch subunit heterodimerization and prevention of ligand-independent proteolytic activation depend, respectively, on a novel domain and the LNR repeats. Mol Cell Biol 2004, 24:9265-9273.
- 100. Overgaard MT, Sorensen ES, Stachowiak D, Boldt HB, Kristensen L, Sottrup-Jensen L, Oxvig C: Complex of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein. Disulfide structure and carbohydrate attachment. J Biol Chem 2003, 278:2106-2117.
- Wouters MA, Rigoutsos I, Chu CK, Feng LL, Sparrow DB, Dun-woodie SL: Evolution of distinct EGF domains with specific functions. Protein Sci 2005, 14:1091-1103.
- 102. Sedgwick SG, Smerdon SJ: The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. Trends Biochem Sci 1999, 24:311-316.
- 103. Li J, Mahajan A, Tsai MD: Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions. 45:15168-15178. Biochemistry 2006.
- 104. Bork P: Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? Proteins 1993, 17:363-374.
- 105. Deregowski V, Gazzerro E, Priest L, Rydziel S, Canalis E: Role of the RAM domain and ankyrin repeats on notch signaling and activity in cells of osteoblastic lineage. J Bone Miner Res 2006, 21:1317-1326.
- Del Bianco C, Aster JC, Blacklow SC: Mutational and energetic studies of Notch I transcription complexes. J Mol Biol 2008, 376:131-140.
- 107. Chen W, Corliss DC: Three modules of zebrafish Mind bomb work cooperatively to promote Delta ubiquitination and endocytosis. Dev Biol 2004, 267:361-373.
- 108. Gu Y, Hukriede NA, Fleming RJ: Serrate expression can function-
- Gu T, Hukriede NA, Fleming RJ: Serrate expression can function-ally replace Delta activity during neuroblast segregation in the Drosophila embryo. Development 1995, 121:855-865.
   Sun X, Artavanis-Tsakonas S: Secreted forms of DELTA and SERRATE define antagonists of Notch signaling in Dro-sophila. Development 1997, 124:3439-3448.
   Rampal R, Arboleda-Velasquez JF, Nita-Lazar A, Kosik KS, Haltiwan-SS. Hight generation of the secret of th
- ger RS: Highly conserved O-fucose sites have distinct effects on Notch I function. J Biol Chem 2005, 280:32133-32140. 111. Bjorklund AK, Ekman D, Elofsson A: Expansion of protein domain
- repeats. PLoS Comput Biol 2006, 2:e114.
- 112. Collins AGC P, McFadden CS, Schierwater B: Phylogenetic context and basal metazoan model systems. Integr Comp Biol 2005, 45:585-594
- 113. Voigt O, Collins AG, Pearse VB, Pearse JS, Ender A, Hadrys H, Schierwater B: Placozoa -- no longer a phylum of one. Curr Biol 2004, 14:R944-945
- 114. Larroux C, Fahey B, Liubicich D, Hinman VF, Gauthier M, Gongora M, Green K, Worheide G, Leys SP, Degnan BM: Developmental expression of transcription factor genes in a demosponge: insights into the origin of metazoan multicellularity. Evol Dev 2006, 8:150-173.
- 115. Moreno-Hagelsieb G, Latimer K: Choosing BLAST options for better detection of orthologs as reciprocal best hits. Bioinformatics 2008, 24:319-324.
- Siminato E, Ledent V, Richards G, Thomas-Chollier M, Kerner P, Coornaert D, Degnan BM, Vervoort M: Origin and diversification of the basic helix-loop-helix gene family in metazoans: insights from comparative genomics. BMC Evol Biol 2007, 7:33.
- 117. Edgar RC: MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. BMC Bioinformatics 2004. 5:113.
- 118. Edgar RC: MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res 2004, 32:1792-1797.
- Hall TA: Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser 1999, 41:95-98.
   Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F,
- Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, et al.: Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Acids Res 2008, 36:W465-469.

- 121. Guindon S, Gascuel O: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol 2003, 52:696-704.
- Felsenstein J: Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 1985, 39:783-791.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F: MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 2001, 17:754-755.
   Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, Bollback JP: Bayesian infer-
- ence of phylogeny and its impact on evolutionary biology. Science 2001, 294:2310-2314.
- 125. Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, Cerutti L, Cuche BA, de Castro E, Lachaize C, Langendijk-Genevaux PS, Sigrist CJ: The 20 years of PROSITE. Nucleic Acids Res 2008, 36:D245-249.
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Gonzales NR, Gwadz M, Hao L, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, et al.: CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. Nucleic Acids Res 2007, 35:D237-240.
- 127. Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, Lopez R: InterProScan: protein domains identifier. Nucleic Acids Res 2005, 33:W116-120.
- 128. Nakai K, Horton P: PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localiza-tion. Trends Biochem Sci 1999, 24:34-36.
- 129. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M: Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science 1986, 234:364-368.
- 130. Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, Seidah NG, Israel A: The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. Proc Natl Acad Sci 1998, 95:8108-8112.
- 131. Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP: SMART, a simple modu-lar architecture research tool: identification of signaling domains. Proc Natl Acad Sci 1998, 95:5857-5864.
- 132. Letunic I, Doerks T, Bork P: SMART 6: recent updates and new
- developments. Nucleic Acids Res 2009, 37:D229-232.
  133. Finn RD, Tate J, Mistry J, Coggill PC, Sammut SJ, Hotz HR, Ceric G, Forslund K, Eddy SR, Sonnhammer EL, Bateman A: The Pfam pro-tein families database. Nucleic Acids Res 2008, 36:D281-288.
  134. Wilson D, Pethica R, Zhou Y, Talbot C, Vogel C, Madera M, Chothia
- C, Gough J: SUPERFAMILY--sophisticated comparative genomics, data mining, visualization and phylogeny. Nucleic Acids Res 2009, 37:D380-386.
- 135. Stechmann A, Cavalier-Smith T: Rooting the eukaryote tree by using a derived gene fusion. Science 2002:89-91.
- Ising a derived gene fusion. Science 2002;87-97.
   Simpson AG, Roger AJ: Eukaryotic evolution: getting to the root of the problem. Curr Biol 2002, 12:R691-693.
   Baldauf SL, Roger AJ, Wenk-Siefert I, Doolittle WF: A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. Science 2000, 290:972-977.
- Bapteste E, Gribaldo S: The genome reduction hypothesis and the phylogeny of eukaryotes. Trends Genet 2003, 19:696-700.
   Black RA, White JM: ADAMs: focus on the protease domain. Curr Opin Cell Biol 1998, 10:654-659.
   Cheng DE, Landard M, English S, Kampa E, Talkat C, Carakara M, Status M,
- 140. Clark RF, Hutton M, Fuldner M, Froelich S, Karran E, Talbot C, Crook R, Lendon C, Prihar G, He C, et al.: The structure of the presenilin I (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. Alzheimer's Disease Collaborative Group. Nat Genet 1995, 11:219-222.
- Ju BG, Jeong S, Bae E, Hyun S, Carroll SB, Yim J, Kim J: Fringe forms a complex with Notch. Nature 2000, 405:191-195.
   Kovall RA, Hendrickson WA: Crystal structure of the nuclear effector of Notch signaling, CSL, bound to DNA. Embo J 2004, 23:3441-3451
- Nam Y, Weng AP, Aster JC, Blacklow SC: Structural require-ments for assembly of the CSL.intracellular Notch I. Mastermind-like I transcriptional activation complex. | Biol Chem 2003, 278:21232-21239.
- Levis Prist Prizz Prizz
- ing. Mol Biol Cell 2007, 18:1-13
- 146. Ingham RJ, Gish G, Pawson T: The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular archi-tecture. Oncogene 2004, 23:1972-1984.

Page 26 of 27 (page number not for citation purposes)

#### BMC Evolutionary Biology 2009, 9:249

- 147. Panin VM, Shao L, Lei L, Moloney DJ, Irvine KD, Haltiwanger RS: Notch ligands are substrates for protein O-fucosyltrans-ferase-1 and Fringe. J Biol Chem 2002, 277:29945-29952.
  148. Kao HY, Ordentlich P, Koyano-Nakagawa N, Tang Z, Downes M, Kintner CR, Evans RM, Kadesch T: A histone deacetylase core-pressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. Genes Dev 1998, 12:2269-2277.
  149. Fisher AL, Ohsako S, Caudy M: The WRPW motif of the hairy-related hasic halix-loop halix repressor proteins acts as a 4.
- related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain. *Mol Cell Biol* 1996, **16**:2670-2677.





## B.3 : Conclusions et perspectives

L'étude de l'origine et de l'évolution de la voie Notch a montré que cette voie s'avère être une synapomorphie des métazoaires, et qu'elle serait composée au minimum de 17 composants. Cependant divers composants ont une origine plus ancienne et/ou serait apparus par transferts latéraux. Les ligands de la voie Notch (ou protéines DSL, Delta et Jagged) ont été retrouvés uniquement chez les animaux. Cependant, nous avons identifié dans le génome du choanoflagellé *Monosiga brevicollis*, une protéine comprenant les domaines minimaux d'un récepteur Notch, sans que l'on puisse conclure sur la signification de la présence de ce gène. Deux hypothèses de scénarios évolutifs ont été proposées et pour l'instant il est impossible de savoir laquelle serait la plus probable. Cette question importante pourra peutêtre être résolue grâce à l'étude de la composition en ligands de la voie Notch chez d'autres métazoaires basaux (i.e. cténophores et autre lignées d'éponges).



# C] Etude de la voie Notch chez Oscarella lobularis

# C.1 : Le répertoire Notch chez le modèle Oscarella lobularis

Nous avons depuis peu à notre disposition des données issues d'un séquençage 454 contenant environ 77 000 séquences assemblées. La recherche des membres de la voie Notch dans notre base de données nous a permis de retrouver la majorité des gènes impliqués dans le fonctionnement de la voie Notch précédemment identifiés chez *Amphimedon queenslandica* (Richards *et al.*, 2008 ; Gazave *et al.*, 2009), comme illustré dans le tableau suivant (les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de copies de gène identifiées).

Composants / modulateurs de la voie	Oscarella lobularis	Amphimedon queenslandica
Notch	Non ?	Oui (1)
Delta	Oui (7)	Oui (5)
Jagged	Non	Non
Su(H)	Oui	Oui
Préséniline	Oui	Oui
Nicastrine	Oui	Oui
Pen2	Oui	Oui
APH1	Oui	Oui
HEY/HES	Oui	Oui
Neuralized	Oui	incomplet
Mindbomb	Oui	Oui
Deltex	Oui	Oui
Su(dx)	Oui	Oui
Mastermind	Non	Non
Notchless	incomplet	Oui
Numb	Non	Non
Sno	Oui	Oui
O-fut	Oui	Oui
Fringe	Oui	Oui
Furin	Non	Non
ADAM 10/17	Oui	Oui
SMRT	Non	Non



(C) : Identification du site de clivage du complexe  $\gamma$ -secretase dans la séquence d'*Amphimedon queenslandica* et localisation de la séquence reconnue par l'anticorps anti-NICD.

J'ai notamment pu identifier sept gènes Delta contenant tous les domaines diagnostiques. Notre banque étant normalisée, on ne peut, d'autant plus, exclure de potentielles contaminations par des organismes présents à l'intérieur de l'éponge lors de l'extraction des ARN messagers. Des analyses phylogénétiques pour les gènes *Delta* ont été réalisées, afin d'écarter de possibles problèmes de contamination et d'assigner des groupes d'orthologie. Dans l'arbre présenté en Figure 41, les séquences d'Oscarella lobularis sont situées à la base de l'arbre, dans des positions peu résolues, tout comme celles de la démosponge, avec des longues branches. De plus, ces sept gènes ont été vérifiés par PCR avec amorces spécifiques sur des ADNc, prouvant ainsi leur appartenance réelle à notre modèle. Des sondes ont été construites et les hybridations in situ sur fragments d'individus entiers et sur lames sont actuellement en cours. Notre banque ne contient malheureusement pas le récepteur Notch de la voie. Plusieurs séquences contenant le domaine LNR diagnostique de la protéine Notch, ont été retrouvées, mais aucune d'elles ne contient l'arrangement complet spécifique d'un Notch. La composition en domaine d'une protéine est un point critique et toute assignation robuste d'orthologie nécessite une analyse de l'architecture de la protéine. En effet, les analyses simples de similarité par Blast ne sont pas forcément rigoureuses et entrainent parfois des erreurs (Nichols et al., 2006 ; Richards et Degnan, 2009). Des RACE-PCR ont donc été tentées sur ces fragments afin d'allonger le gène, mais sans succès. La structure du gène Notch rend sa recherche par PCR malaisée, le domaine LNR étant présent dans d'autres protéines (Gazave et al., 2009). De même, réaliser des hybridations in situ sur ces fragments serait sans intérêt.

## C.2 : Immunolocalisation de la protéine Notch

Le gène *Notch* étant absent de notre base de données, nous avons décidé de localiser directement la protéine Notch à l'aide d'expériences d'immunohistochimie (IHC) sur coupes. Pour cela nous avons utilisé un anticorps polyclonal reconnaissant la partie N-terminale de la partie intracellulaire clivée de la protéine Notch I humaine (Notch intra cellular domain = NICD) (Figure 42A). Cet anticorps (de lapin) est non spécifique, la séquence du gène chez *Oscarella lobularis* nous étant inconnue. Un témoin positif (anticorps anti- $\alpha$  tubuline) et divers témoins négatifs (trois différents) ont été réalisés en parallèle (Figure 42B). L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps anti-IgG de lapin couplé à un fluorochrome FITC



Figure 43 : (A) Photo prise au microscope à épifluorescence illustrant les résultats de l'expérience d'IHC. En bleu : les noyaux marqués au DAPI, en vert, le marquage à l'anticorps anti-NICD. (B)Témoin positif de l'expérience d'IHC. En bleu : les noyaux marqués au DAPI, en vert, le marquage à l'anticorps anti- $\alpha$ -tubuline.

(C) Coupe semi-fine d'un cyste spermatique d'éponge, les noyaux sont colorés en violet. Sp : cyste spermatique, Fl : flagelles, No : noyaux, CCh : chambres choanocytaires, Ca : canaux
(Fluoresceine isothiocyanate). Le protocole mis en place a été modifié et adapté d'après divers protocoles et est présenté en Annexe IV (Mukhina et al., 2006 ; Abedin et King, 2008). Lors de l'utilisation d'anticorps non spécifiques comme c'est le cas ici, on ne peut jamais exclure une fixation sur une autre protéine dont la distribution serait reproductible. En effet, il arrive qu'une réaction croisée ait lieu, et ainsi l'anticorps va parfois se fixer sur un épitope similaire d'une autre protéine que celle ciblée. Il est donc indispensable de prouver la spécificité de ce marquage. La procédure classique pour prouver cette spécificité anticorpsprotéine reconnue serait de faire exprimer in vitro (par exemple dans une bactérie) la protéine Notch (donc synthétisée à partir de l'ADNc complet) et ensuite de réaliser un Western Blot. Cette procédure est inenvisageable dans notre cas puisque la séquence de l'ARNm est inconnue ou très partielle. Nous avons également envisagé d'utiliser plusieurs anticorps différents (non spécifiques) reconnaissant soit la partie intracellulaire du Notch soit le Notch complet. Si les profils obtenus s'avéraient compatibles entre eux, cela aurait pu permettre de suggérer (à défaut de démontrer) la spécificité du marquage obtenu. Ce procédé bien qu'intéressant se montre assez couteux et n'a donc pas été entrepris pour l'instant. Nous avons donc décidé d'identifier en premier lieu, le site de clivage de la  $\gamma$ -sécrétase sur la seule séquence Notch d'éponge connue (Amphimedon queenslandica) et de regarder si la séquence reconnue par l'anticorps (donnée par le fournisseur) pourrait être compatible avec celle d'éponge. L'analyse de cette séquence de Notch nous a permis de trouver le site potentiel de clivage de la  $\gamma$ -sécrétase et a mis en évidence que sur les treize acides aminés reconnus par l'anticorps, seuls six semblent conservés (Figure 42C).

Une fluorescence intense a pu être observée dans les choanocytes à chaque réplicat (Figure 43A). Les témoins négatifs étaient valides et le témoin positif montrait une fluorescence au niveau des flagelles des spermatozoïdes des cystes spermatiques et dans les flagelles des choanocytes tel qu'attendu (Figure 43B).

Cette expérience d'IHC a donné lieu à des résultats intéressants et intrigants. Bien que ce marquage soit net et reproductible, les résultats des analyses de séquences ne permettent pas d'être sûr que l'anticorps s'est fixé spécifiquement. Cependant le degré de divergence entre la séquence d'*Amphimedon queenslandica* et celle supposée d'*Oscarella lobularis* ne peut être estimé et il est possible que la séquence d'*Oscarella lobularis* présente plus (ou moins) de six acides aminés identiques dans cette zone. Une autre expérience visant à prouver



la spécificité du marquage obtenu peut être l'utilisation d'un inhibiteur chimique spécifique d'un membre de la voie Notch, elle sera développée dans la partie suivante.

#### *C.3* : *Expérience d'inhibition chimique de la voie Notch*

Il existe à l'heure actuelle un seul inhibiteur chimique connu de la voie Notch, il s'agit du DAPT ou (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) (Dovey *et al.*, 2001). Cet inhibiteur synthétique cible le complexe  $\gamma$ -sécrétase (Figure 44A) et plus précisément le fragment C-terminal de la préséniline (Morohashi *et al.*, 2006). Des études réalisées chez la drosophile et le poisson zèbre ont fortement suggéré que l'utilisation de cette drogue générait un phénotype similaire à celui obtenu lors de mutations du gène *Notch*, c'est-à-dire une augmentation des cellules ayant un destin neural (Geling *et al.*, 2002 ; Micchelli *et al.*, 2003). Cet inhibiteur a également été utilisé avec succès, plus récemment, chez *Hydra vulgaris*, où il a été démontré que le DAPT bloquait la translocation dans le noyau du NICD (Kasbauer *et al.*, 2007). Dans les conditions classiques, le complexe  $\gamma$ -sécrétase clive le récepteur Notch et libère l'épitope reconnu par l'ancêtre commun. En présence de DAPT, le complexe  $\gamma$ -sécrétase la clive et l'épitope reconnu par l'ancètre du set dans les choanocytes disparaisse.

Les expériences d'inhibition chimique avec le DAPT ont été réalisées suivant le protocole détaillé en Annexe IV. Après récolte, des fragments d'*Oscarella lobularis* ont été laissés pendant environ trois jours dans les aquariums afin de se régénérer. Puis, ils ont été placés dans des boîtes de Pétri contenant diverses solutions (DAPT, DMSO = témoin négatif et eau de mer = témoin négatif) pendant 2h, 6h, 24h ou 48h à 15 °C. Les échantillons ont été ensuite fixés et inclus. Puis, les échantillons traités et témoins ont été utilisés pour réaliser les expériences d'IHC avec l'anticorps anti-NICD (+ témoins) comme précédemment décrit.

Les résultats obtenus lors des IHC ne semblent montrer aucun effet du DAPT sur le marquage : quel que soit le temps considéré, le marquage dans les choanocytes est retrouvé dans les échantillons traités au DAPT comme dans les témoins négatifs (sans DAPT). Ces

expériences n'ayant jamais été réalisées chez les éponges, nous ne pouvons actuellement conclure si (i) l'inhibition chimique par l'utilisation du DAPT ne fonctionne pas chez les éponges, comme c'est le cas chez *Caenorhabditis elegans* (F. Rentzsch, communication personnelle) ou si (ii) l'anticorps anti-NICD se fixe de façon non spécifique.

#### C.4 : Perspectives d'étude de la voie Notch chez Oscarella lobularis

#### Identification d'autres acteurs majeurs de la voie et obtention de leurs patrons d'expression

Afin de caractériser plus précisément la voie Notch chez les éponges et en particulier chez notre modèle *Oscarella lobularis*, il faudrait dans un premier temps obtenir les profils d'expression des sept gènes *Delta* à notre disposition. Les expériences d'hybridation *in situ* sont actuellement en cours. L'étude des gènes à *bHLH* et leur assignation phylogénétique aux familles actuellement reconnues serait également intéressante à réaliser (Simionato *et al.*, 2007). L'obtention du gène Notch va s'avérer également indispensable pour compléter cette étude. Les expériences de RACE-PCR n'ayant pas donné de résultats concluants, une autre technique peut être envisagée. Il s'agit de la LAM-PCR, processus d'amplification linéaire de la séquence située en amont/aval d'une région génomique connue, réalisée par une entreprise de biotechnologie. L'obtention du profil d'expression du gène *Notch* compatible ou non avec le marquage obtenu lors des expériences d'immunohistochimie nous permettrait de conclure quant à la spécificité de l'anticorps utilisé.

# *Expériences d'inhibition et d'activation chimique de la voie : conséquences phénotypiques et génétiques*

Concernant les expériences d'inhibition chimique avec le DAPT, il serait également possible de compléter les résultats préliminaires obtenus en observant au microscope électronique à balayage les échantillons traités. Si nous partons de l'hypothèse que les choanocytes seraient les cellules régulées par la voie Notch chez l'adulte d'*O. lobularis*, et si on se réfère aux phénotypes « neurogéniques » observés chez les bilatériens lors de l'inhibition de cette voie, nous nous attendrions à observer une augmentation du nombre de choanocytes chez les échantillons traités. Parallèlement, il serait également intéressant d'utiliser un activateur de la



Figure 45 : Modèle d'activation de la voie Notch par le MeHg. En absence de MeHg la protéase de la famille ADAM est inactive. Lors de l'ajout de MeHg, elle devient active et peut donc cliver le récepteur Notch (clivage S2). Après le 3<sup>e</sup> clivage, le récepteur pourra être transloqué dans le noyau et participer à l'activation des gènes cibles (Bland et Rand, 2006).

voie et d'observer les conséquences phénotypiques entrainées par cette modification. Il existe un activateur de la voie Notch, une neurotoxine, le méthylmercure (MeHg) (Bland et Rand, 2006). Au niveau cellulaire, le MeHg induit l'inhibition des récepteurs aux neurotransmetteurs et également des canaux calcium-dépendant. Au niveau moléculaire, l'action du MeHg est assez mal connue, mais on suppose que les protéines de la famille ADAMs (a disintegrin and metalloprotease) en sont des cibles potentielles. Ainsi, il a été montré chez la drosophile et le rat que l'ajout de MeHg induisait une activation de la voie Notch, *via* l'activation des protéines ADAM, responsable du deuxième clivage du récepteur Notch (Figure 45) (Bland et Rand, 2006 ; Tamm *et al.*, 2008). On pourrait donc s'attendre, suite à l'utilisation de cet activateur chez notre éponge à une réduction du nombre de choanocytes chez les échantillons traités. Les patrons d'expression des gènes cibles *bHLH* lors de ces diverses expériences d'inhibition et d'activation de la voie pourront également être très informatifs.



Figure 46 : Expression des gènes neurogéniques *Delta*, *Notch* et *bHLH1* chez *Amphimedon queenslandica* sur coupes et individus entiers (Richards *et al.*, 2008). Au stade de développement « spot » les 3 gènes sont exprimés dans la couche extérieure (A-D), au stade « early ring », les expressions de ces gènes ont migré au niveau de la couche sous-épithéliale, au niveau des cellules globulaires (E-H). Les cellules globulaires sont indiquées par une flèche (E'-H'). Au stade « late ring », les cellules globulaires migrant à l'extérieur de la couche sousépithéliale expriment fortement le gène *AmqDelta1* alors que les gènes *AmqNotch* et *AmqbHLH1* sont toujours exprimés dans la couche sous-épithéliale (J-L, J'-L'). F', G', H' et J', K', L' représentent des agrandissements des zones entourées des images F, G, H et J, K, L respectivement.

# **D]** Conclusion

La voie Notch est un système de communication entre cellules, de type juxtacrine, ayant un rôle majeur lors du développement des animaux. Comme nous venons de le voir dans ce chapitre avec l'article 4, l'origine des composants de la voie est parfois très ancienne bien que la voie dans son ensemble soit une synapomorphie des métazoaires. Un ensemble minimal de gènes est présent chez les éponges et donc l'était sans doute également chez l'ancêtre commun des métazoaires (Gazave et al., 2009). La fonction de cette voie dans la mise en place du système neuro-sensoriel semble être conservée à l'échelle des eumétazoaires via l'activation par la voie Notch (gènes neurogéniques) de facteurs de transcription à domaine bHLH (gènes proneuraux) très fortement associés à la spécification du destin neuro-sensoriel des cellules. Chez les éponges, notre étude encore trop préliminaire ne permet pas à l'heure actuelle de conclure sur le rôle de la voie Notch chez Oscarella lobularis. Cependant, une étude récente chez la démosponge Amphimedon queenslandica semble indiquer l'implication de cette voie dans la formation de cellules de type sensoriel : les cellules globulaires (Richards et al., 2008). En effet, dans le génome de cette éponge, plusieurs gènes codant pour des protéines à bHLH ont été identifiées, notamment un gène AmgbHLH1, un homologue probable des gènes proneuraux atonal/neurogenin, qui contrôlent la détermination initiale des cellules neurales de bilatériens (Simionato et al., 2007 ; Richards et al., 2008 ; Simionato, 2008). Les gènes neurogéniques Delta et Notch ont également été identifiés chez A. queenslandica. Les profils d'expression de ces trois gènes ont montré leur implication lors de la formation des cellules globulaires de cette éponge (Figure 46). Des analyses fonctionnelles de transgenèse chez la drosophile et le xénope, ont montré, pour la première fois, que l'injection d'un gène d'éponge pouvait avoir des conséquences phénotypique sur des embryons de bilatériens. En effet, l'injection d'AmqbHLH1 chez le xénope a induit la formation ectopique de neurones sensoriels, comme c'est le cas lors d'injections du gène neurogenin (un gène bHLH) de xénope. Chez la drosophile, cette expérience induit la formation ectopique d'organes neurosensoriels, comme c'est le cas lors d'injections du gène atonal (un gène bHLH) de drosophile. Ainsi, ce gène bHLH1 d'éponge possède une activité proneurale qui est une combinaison des propriétés proneurales des gènes neurogenin et atonal de bilatériens (Figure 47) (Richards et al., 2008). Il semle donc que le mécanisme de mise en place du système nerveux des bilatériens via l'utilisation de gènes proneuraux de type bHLH et le processus d'inhibition latérale de la voie Notch étaient déjà présents et fonctionnels



Figure 47 : Schéma retraçant l'évolution des familles de gènes à *bHLH* associée à l'évolution des circuits neurogenétiques et à l'évolution de la morphologie du système nerveux chez les métazoaires.

L'émergence des gènes *Delta* et *Notch*, et l'expansion des familles de gènes à *bHLH* aurait eu lieu après la divergence des choanoflagellés, dans la lignée de métazoaires. L'acquisition de cellules sensorielles différenciées peut être corrélée à l'acquisition de la multicellularité.

Une phase d'expansion initiale chez les gènes à bHLH du groupe A aurait eu lieu avant la divergence des éponges. Une 2<sup>e</sup> phase majeure d'expansion de cette famille aurait eu lieu par la suite dans la lignée des eumétazoaires. Le gène *AmqbHLH* a des capacités neurales comparables à celles des gènes de la superfamille Atonal des bilatériens. Cette capacité proneurale pourrait déjà être présente chez un gène ancestral commun à la super-famille Atonal et à *AmqbHLH*: le gène *protoAtonal* (Richards *et al.*, 2008)

chez l'ancêtre commun de tous les animaux (Figure 47) (Richards et al., 2008 ; Simionato, 2008). Chez les éponges, ils seraient impliqués dans la formation de cellules neurosensorielles qui pourraient être les homologues des neurones de bilatériens, cette hypothèse étant confortée par la présence dans ces cellules globulaire de gènes post-synaptiques (Sakarya et al., 2007). Cependant, ces cellules globulaires sont spécifiques de certaines éponges et on ne les retrouve pas dans toutes les lignées d'éponges. Ainsi l'étude de la voie Notch dans d'autre lignées est indispensable afin d'étayer les hypothèses concernant la fonction ancestrale de cette voie. Au delà de la stratégie de multiplication des modèles, il est également indispensable de réaliser des expériences d'analyses fonctionnelles de la voie. Nos expériences d'inhibition chimique avec le DAPT visent à répondre à cette problématique. Cependant, on ne peut exclure que la voie Notch chez les éponges fonctionne un peu différemment (au delà du processus d'inhibition latérale) et que la translocation du NICD dans le noyau ne soit pas dépendante d'un clivage par le complexe  $\gamma$ -sécrétase. Dans ce cas l'utilisation du DAPT ne serait pas effective et seules des expériences d'injection d'ARNi pourraient nous permettre de conclure. Or à l'heure actuelle ces expériences ne sont pas encore disponibles chez les éponges.

# **CHAPITRE VI**

Discussion générale et perspectives



Figure 48 : Hypothèse concernant l'origine de la neurogenèse et l'acquisition d'un système nerveux central au cours de l'évolution des animaux. Les cellules présentant des jonctions synaptiques sont présentes chez l'ancêtre commun des eumétazoaires alors que des cellules sensorielles seraient apparues chez l'ancêtre commun des choanoflagellés et des métazoaires. Les cténophores et les cnidaires possèdent un système nerveux différencié. La position des cténophores, éponges et placozoaires est controversée. \* indique les espèces ayant un génome séquencé, <sup>e</sup> les espèces possédant des yeux différenciés et <sup>o</sup> les espèces ayant perdu le stade méduse (Galliot *et al.*, 2009).

Suite à l'émergence de la multicellularité, l'apparition d'un système coordonné de communication intercellulaire, le système neuro-sensoriel, est considérée comme un évènement clef de l'évolution des métazoaires. Nous avons vu précédemment que chez les animaux actuels, le système neuro-sensoriel est très diversifié, résultant d'une longue histoire évolutive (Figure 48). Les cnidaires et les cténophores permettront sans nul doute d'éclairer la diversification précoce du système nerveux. Mais, afin d'appréhender les questions relatives à son origine et aux toutes premières étapes de son évolution, examiner les systèmes de communication pré-nerveux chez des animaux aneuraux est indispensable. A l'heure actuelle, seuls deux taxons sont dépourvus de système nerveux: les éponges et le placozoaire (Figure 48) (Leys et Meech, 2006). Dans cette perspective, ce travail de thèse s'est articulé autour de la recherche chez le modèle éponge Homoscleromorpha Oscarella lobularis de gènes impliqués dans la mise en place du système nerveux des eumétazoaires. Bien que ce soit un point fondamental, ces études comparatives entre éponges et eumétazoaires ne doivent bien évidemment pas se limiter à la recherche de gènes. Il faut également étendre les travaux à d'autres champs de recherche, comme l'identification de neurotransmetteurs et de structures cellulaires potentiellement impliquées dans leur sécrétion. De plus, l'aspect physiologique, bien que délicat à mettre en place chez ces animaux marins, doit être également exploré. L'interprétation de toutes ces études nécessite également une connaissance histologique parfaite du modèle d'étude.

# A] Origine et évolution du système neuro-sensoriel

La multicellularité a engendré, dans certains cas, une spécialisation cellulaire permettant d'assurer les fonctions physiologiques (contraction, nutrition, ou perception de la lumière ...) par des cellules distinctes. Bien que certains animaux possèdent peu de types cellulaires, il en existe chez l'homme des centaines (Arendt, 2008). Un des défis de l'évo-dévo est d'expliquer comment cette diversité de types cellulaires a évolué, en identifiant les types cellulaires homologues entre espèces. Initialement, cette recherche s'est faite par comparaison des morphologies des cellules en microscopie. Cependant, cette comparaison est parfois difficile et subjective entre phylums distincts et les hypothèses d'homologies délicates à émettre. Ces dernières années des progrès considérables ont été faits en biologie moléculaire, notamment avec les empreintes génétiques. Cela a permis l'obtention de profils d'expression de gènes

				PORIFERA epithelial-like cells sensory-like cells chemical conduction polarity filtrate-feeders	CNIDARIA myoepithelial cells, smooth / striated muscle cells, tissue layers, oral-aboral polarity active behaviors (carnivorous), camera eye, rhopalia	URBILATERIA VERTEBRATES   AP + DV axes forebrain   mouth, anus, head neural crests   central nervous system inner ear   peripheric nervous system myelin sheath   glial cells Vertebrates
			Notch	Notch / delta	Notch <sup>°</sup> / delta	Notch / delta
NG			Wnt	Wnt7/8-like	Wnt1, Wnt2, Wnt3 <sup>PA</sup> , Wnt4, Wnt5, Wnt6, Wnt7, Wnt8, Wnt10, Wnt11, WntA	Whith, Whit2, Whit3, Whit4, Whit5, Whit6, Whit7, Whit8, Whit9 (?), Whit10, Whit11, WhitA
1			Wnt antagonists	?	Dkk1/2/4 <sup>N</sup> , Dkk3°	Dkk1/2/4, Dkk3
A			BMP	GDNF-like	BMP2/4, BMP5/8	GDNF-like
5		1.5	BMP-antagonists		chordin, gremlin, follistatin	
S			FGF	?	FGF-D*, orphans	FGF-A, FGF-D, FGF-H
			FGF antagonist	?	sprouty	sprouty
			Hedgehog	Hedgling	Hedgling, Hedgehog	Hedgling, Hedgehog
			patched	patched	patched	patched
			Jak/Stat	Jak/Stat	Jak/Stat	Jak/Stat
ĺ		lass	NK-type	NK2-4, NK5-7, Tlx, Hex, Msx, BarH, Barx	NK3, NK4, 2, NK5, 6, 7, Tlx, Hex, <u>Msx,</u> Barx, <b>Hix, Lbx, <u>Not*, Emx*, Dix, ro, NK1,</u></b>	Msx, Not, Emx, Dlx, BarH, Barx, Hlx, <b>Dbx</b> , Lbx, Hex, Tlx, NK3, NK4, NK2, NK5, NK6, NK7
		4	EHGBox	not detected	Gbx, Mnx	Gbx, Mnx, en
	ES	IN	ParaHox	not detected	<u>Gsx</u> *°, Pdx, Cdx	Gsx, Pdx, Cdx
	E	A	Hox	not detected	PG1, PG2, Hox-like, Mox, Evx	PG1, PG2, PG3, PG4, PG9, Mox, evx
S	air	SE	paired-like	arx, Hbn, rx, OG-2	arx (prdl-b, alx), hbn/prdl-a, rx, OG-2, repo	arx, hbn, rx, OG-2, repo, ceh-10, Alx3/4, unc4,
H	mo	-	(Q50)		ceh-10, Alx3/4, unc4, Otp, OG12, Dux, rax	Otp. OG12, Dux, Arix, Prx
-	po	2	Otx-like (K50)	not detected	Otx, Gsc, Ptx, Dmbx	Otx, Gsc, Ptx, Dmbx
SS	me	e.	Pax (S50)	PaxB (2/5/8)	PaxB(2/5/8), PaxA/C (pox neuro), PaxD(3/7)	Pax2/5/8, pox neuro, Pax3/7, Pax1/9, Pax4/6
Ö	2		Six-class HP	Six-1/2	Six-1/2, Six-3/6, Six-4/5	Six-1/2, Six-3/6, Six-4/5
E	-		POU-class HP	POU I, POU VI, POU II-IV	POU I, POU II-III, POU IV, POU VI	POU I, POU II, POU III, POU IV, POU VI
A			LIM-class HP	Lim3, lin11, islet	Lim3, lin11, islet, Lmx, Apt, Lhx6/7	Lim3, lin11, Lmx, islet, apt, Lhx6/7
LC		_	TALE-class HP	Irx, TALE	Irx, Pbx, Tgif, Meis	Irx, Pbx, Tgif, Meis
-		I	Twist-class	not detected	Mesp, Hand, Paraxis, SCL, Twist, PTFb	Mesp, MyoR, Hand, Paraxis, SCL, NSCL, Twist, PTFb, PTFa
5		보	Atonal-class	Net-like,	Net, Atonal-like/Atl1*,Atl2,orphans1,2,3,4	Net, Atl.Neurogenin,NeuroD,Beta3,Olig,Mist,Delilah
F		-	Achaete-Scute	Asc-like	ASCa*°, ASCb	ASCa, ASCb
RIP		Nu	clear Receptors	HNF4	<u>COUP-TF</u> *°, <u>RXR</u> <sup>€</sup> , other families ?	Type II: HNF4(2A), RXR(2B), TR2/4(2C), TII(2D), COUP-TF(2E); Type I: Rev-erb, THR, RAR, Ftzf
NSC		C	2H2 Zinc finger	2	Zic°, Gli, snail, other families ?	Zic/Odd, Gli, KLF, SP, Wilms' tumour, Huckebein, Snail, Ovo, Spalt, Blimp-1, Fez
TRA			bZIP	CREBZF, Jun, Xbp1, ATF2 CREB <sup>T</sup> , CREM <sup>T</sup> , NFE2 <sup>T</sup> ,	<b>PAR, Oasis-b, ATF6</b> , <u>CREB**</u> , Xbp1, S-Maf, NFE2, Jun, ATF4, ATF3, ATF2,	PAR, <b>E4BP4</b> , Oasis, Oasis-b, ATF6, CREB, Xbp1, S-Maf, <b>L-Maf</b> , NFE2, <b>Bach</b> , Jun, ATF4, Fos, ATF3, BATF, C/EBP, <b>c/EBP-g</b> ,
			SOX/TCF	SoxB, SoxC, SoxF, TCF	SoxB, SoxC, SoxE, SoxF, TCF <sup>4</sup>	SoxA, SoxB, SoxC, SoxD, SoxE, SoxF, SoxG, SoxH, SoxI, SoxJ, TCF
			FOX	FoxD,proFox,FoxG,FoxL2, Fox1, FoxP, FoxJ	FoxA, B, A/B, C, D, E, FoxG, FoxK, FoxJ, FoxL2, FoxN2/3,FoxO,FoxP, FoxQ2	FoxA, B, A/B, C, D, E, FoxF, FoxG, J, K, FoxL1, FoxL2, FoxN1/4, FoxP, Q2,
			MADS box	Mef2	Mef2, SRF°	type I (Srf), type II (Mef2)
			ETS box	Ets	Ets-domain gene families ?	Ets-domain gene families ?
			T-box	Bra, Tbx1, Tbx4/5, Tbx2/3*	Bra1 <sup>A</sup> , Tbx4/5, Tbx2/3, Tbx1/10, Tbx15, Tbx20	Bra, Tbr, Tbx4/5, 2/3, 1/10, 15/18/22, 20, Tbx6
8			Runx/CBFbeta	Runx, CBFbeta	Runx, CBFbeta	Runx, CBFbeta

Figure 49 : Diversification précoce du répertoire génétique impliqué dans la neurogenèse des bilatériens. Les gènes potentiellement impliqués dans la formation du SN des cnidaires sont soulignés et la lignée cellulaire indiquée quand des données d'expression ou fonctionnelles sont disponibles : neurogenèse (\*), nématogenèse (°), différenciation des yeux ( $\in$ ). Les voies de signalisation et facteurs de transcription présents chez les éponges et/ou le placozoaire (mentionnés par un T) représentent des familles de gènes qui ont émergé chez l'ancêtre commun des métazoaires ou avant. Les familles de gènes qui ont émergé plus tard, soit chez les eumétazoaires soit chez les bilatériens sont indiquées en gras dans leurs colonnes respectives. Les familles de gènes à partir de laquelle sont apparues toutes les familles des gènes présentes chez les bilatériens a eu lieu chez l'ancêtre commun des eumétazoaires (Galliot *et al.*, 2009).

spécifiques de différents types cellulaires, chez quelques espèces de bilatériens modèles, permettant d'identifier de façon plus robuste les types de cellules homologues (Manuel, 2007 ; Arendt, 2008). Mais des difficultés perdurent, notamment dans la définition exacte et non arbitraire des catégories cellulaires (Manuel, 2007). C'est tout particulièrement le cas pour les cellules nerveuses dont la diversité cellulaire est considérable. Les cellules sensorielles, quant à elles, sont fortement associées aux cellules nerveuses et, chez certains organismes comme les cnidaires, la distinction entre ces deux types cellulaires n'est pas nette. Il peut sembler parfois plus judicieux de parler de cellules neuro-sensorielles.

On constate un nombre bien plus restreint de types cellulaires chez les éponges (Simpson, 1984) et chez les autres non-bilatériens que chez les bilatériens. De ce fait, les éventuelles cellules impliquées dans des fonctions neuro-sensorielles chez les éponges pourraient être soit des cellules dont le rôle est peu ou mal connu soit des cellules auxquelles on attribue des rôles différents. En absence de neurones chez ces organismes l'identification des types cellulaires potentiellement impliqués dans l'émergence d'un système neuro-sensoriel peut paraître délicate à mettre en place. Cependant, diverses approches peuvent être envisagées, comme nous allons le voir.

*A.1*: Approche génétique : Identification de la «boîte à outils moléculaires» du système neuro-sensoriel ancestral des animaux, du «protoneurone» à « ursynapse »

Les principales voies de signalisation et une multitude de facteurs de transcription sont impliqués dans la mise en place et le fonctionnement du système nerveux des bilatériens. Parmi eux, un grand nombre de gènes sont déjà connus comme étant présents chez les éponges et quelques données d'expression sont disponibles (Figure 49) Une stratégie de recherche systématique chez les éponges de gènes impliqués dans la neurogenèse chez les bilatériens et/ou les cnidaires permettra sûrement à court terme d'identifier une potentielle « boîte à outils moléculaire » du système neurosensoriel ancestral. Mais la recherche chez les éponges de gènes impliqués dans la mise en place d'un système neuro-sensoriel ne se limite pas aux gènes potentiellement associés à la boîte à outils moléculaires de la cellule neuro-sensorielle ancestrale. Cela implique également d'identifier des éléments pré- et post-



synaptiques, la synapse étant un élément fonctionnel fondamental de tout système neurosensoriel (Kosik, 2009 ; Ryan et Grant, 2009). De plus, la synapse est un élément cellulaire qui a été fortement étudié mais jusqu'alors peu d'informations sur son origine et son évolution étaient connues (Ryan et Grant, 2009). Bien que certains travaux anciens aient parfois suggéré la présence de synapses chez les éponges (Nickel et Schiller, 2010), aucune preuve histologique de leur présence n'a, à l'heure actuelle, été fournie (Simpson, 1984 ; Leys *et al.*, 2007). La recherche de gènes codant pour des éléments post-synaptiques chez les différentes lignées d'éponges et les choanoflagellés (groupe frère des métazoaires (King *et al.*, 2008)) permettra d'appréhender la composition de la structure ancestrale à toutes les synapses « ursynapse » et les gènes « protosynapse » qui auraient vraisemblablement contribué à leur émergence (Ryan et Grant, 2009). Une analyse récente chez *Monosiga brevicollis* a déjà révélé que les protéines clés de l'échafaudage post-synaptique étaient déjà présentes chez l'ancêtre commun des Holozoa (Alie et Manuel, 2010).

Ces divers éléments (gènes impliqués dans la neurogenèse et éléments pré- et postsynaptiques) ont été majoritairement recherchés et caractérisés dans le seul génome d'éponge actuellement disponible, or il est également important d'étendre ces recherches à des organismes appartenant aux autres lignées. Nous avons à notre disposition quelques EST d'éponges représentantes de chacune des quatre lignées: *Oopsacas minuta, Sycon raphanus, Ephydatia* sp. et *Oscarella lobularis*. De plus, nous possédons depuis quelques mois une banque normalisée issue d'un séquençage 454 d'ADNc chez *Oscarella lobularis*. Son analyse, actuellement en cours en collaboration avec Thomas Sorger<sup>9</sup> et Pierre Pontarotti<sup>10</sup>, a fourni d'ores et déjà des résultats préliminaires intéressants. Plusieurs gènes, associés aux processus cellulaires de : réponse aux drogues, transport d'ion sodium, développement du système nerveux, transport de molécules par des vésicules, ont déjà été identifiés et viennent compléter les premiers éléments précédemment caractérisés dans nos banques EST (*synaptotagmine, synaprogyrine, Sox*) (Figure 50).

Bien que cette approche génétique soit indispensable et en plein essor à l'heure actuelle, il faut cependant rester prudent quant aux interprétations des résultats obtenus. L'estimation du nombre de gènes contenus dans les génomes d'organismes aussi variés que l'homme (30 000)

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> Professeur à l'université Roger Williams, Bristol

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> Directeur de recherches à l'université de Provence, Marseille

	and the second se				Evidence III sp	cafin
Heceptor system	Background	Heterences	Phylum	Species	Physiology	Genomi
				Sycon sp.	ACh esterase (AChE) activity (histochemistry)	
			Caldispongia	Scypha sp.	No AChE activity (histochemistry)	
Acetylcholine	ligand-gated ion channels (nicotinic receptors), metabotrophic receptors	(Walker et al. 1996; Walker and Holdon		L. aspera H. communis	No. A ChE activity (histochemistry) A ChE activity (histochemistry): A Ch horizased rhythm and intensity of contraction	
receptors	Acetylcholine esterase (AChE	Dye 1991		C, celata	AUR: slight reduction or current and slight dosure of oscule; hisotine: current reduced	
	silao Bintytoniyin noon in yawaa		Demospongiae	S. lacustris	No AChE activity (histochemistry)	
				S. crasse	No AChE activity (histochemistry)	
				T. wihelms	AChE activity (histochemistry); ACh: no induction of contraction, but alters frequency, montime; no effects	
Adenosine receptors	Metabotrophic receptors, Invied to ATP-driven energy metabolims, pathway strongly interact with other signalling pathways. Cefferine acts as	(Fredholm et al. 2000; Walker et al. 1936)	Demogram	T. whems	Caffeine : increased endogenous contraction fry firm; attenuated amplitude	
	holi-specific antagonist.	Chardissa at at			Clucina stimulatas contraction acceleratas	
Glycine receptor	Ligand-gated ion channel	1997; Pieroban et al. 2001)	Demospongrae	T. wihelma	endogenous contraction rhythm, attenuates amplitude	
			Caldispongia	C. clathrus	Glutamate induces contraction	
			Homosoleromorpha	Oscarella sp.	Glutamete induces contraction	
a second second		Multiple at al 1000-		T.wiheima	CABA/Glutamate induces and modulates contraction	
GABA/glutamate	Metabotrophic and ionotrophic recentors	Walker and Holden-		C. celata	GABA: decreased pumping activity	
Inceptors		Dye 1991)	Demospongiae	C. mucula	Immunohistochemical demonstration of GABAe recedens	
				G. cydonum	GABA/glutamate induces intracellular Ca2+ release	GABA/glutamate-like re
			Contraction of the second	A. queenslandice		GABA <sub>6</sub> receptor
Adrenergic receptor	G-protein coupled receptor: among others involved in circadian rhythm regulation	(Shibata 2004)	Calcispongia Demospongiae	Sycon sp. T. wihelma	Adrenatine: sight reduction of pumping rates Adrenatin: disturbes endogenous rhythm	
			Calcispongia	Sycon sp.	Serotonin present in cells (histochemistry)	
C UT montone	G-protein coupled receptors:	filment of second		C, celata	Serotonie: no effect upon currents	
Siongenerations	ligand-gated ion channels	(hoyer et al. 1994)	Demospongiae	T. ignis	Serotonine present in larvae (immunohistochemistry)	
				T. wihema	Serotomine: induced contractions	
Nitric oxide		(Colasanti and Vanturini 1998:		T. wihelma	NO: induces contractions, modulates endogenous rhythm and contraction amplitude	
receptor	Soluble Guarylate Cyclase	Jacklet 1997;	Demospongiae	C. nucula	NO involved in temperature signaling cascade	
	630	Walker et al. 1990)	8	A. queensiandice		NO synthase (NO6

et *Arabidopsis* (30 000) a mis en évidence le fait que l'apparente différence de complexité entre ces deux espèces n'est pas due au nombre de gènes qu'elles possèdent. En effet, la cooption de gènes pré-existant pour assurer des fonctions différentes est un phénomène très courant et possiblement l'évènement central ayant permis l'évolution des systèmes développementaux et métaboliques (True et Carroll, 2002). Ainsi, les gènes retrouvés chez les éponges impliqués dans le système nerveux des bilatériens n'ont donc pas forcément une fonction ancestrale reliée à ce processus.

#### A.2: Approche physiologique : Identification de neurotransmetteurs

En parallèle de la caractérisation moléculaire des homologues des éléments impliqués dans la mise en place du système nerveux chez les bilatériens et des éléments pré- et postsynaptiques, il est important de rechercher des éléments potentiellement associés à une communication chimique et/ou électrochimique entre cellules chez les éponges, comme les neurotransmetteurs. Ce sont des molécules chimiques synthétisées dans la vésicule présynaptique, libérées dans la fente synaptique et qui se lient aux récepteurs post-synaptiques (Figure 25B). Plus d'une centaine de neurotransmetteurs ont été identifiés jusqu'alors chez l'homme (Purves et al., 2004). Ces substances peuvent être classées en deux grandes catégories, les neuropeptides et les petites molécules. Chez les éponges, la présence de plusieurs neurotransmetteurs a déjà été montrée, et ce, dès 1941 (pour revue, voir (Simpson, 1984 ; Renard *et al.*, 2009)). Les systèmes de réception chimique et les neurotransmetteurs potentiels identifiés chez les éponges sont résumés dans la Figure 51 (Nickel et Schiller, 2010). Pour la plupart, l'identification s'est faite d'un point de vue physiologique : l'ajout de ces substances chimiques a induit des modifications des contractions rythmiques intrinsèques chez la majorité des espèces testées (Ellwanger et Nickel, 2006 ; Ellwanger et al., 2007). Dans d'autres rares cas, la présence de neurotransmetteurs (GABA et de sérotonine) chez les éponges a été montrée via des expériences d'immunohistochimie (Weyrer et al., 1999 ; Ramoino et al., 2007). Plus rarement encore, les gènes codant pour des récepteurs à certains neurotransmetteurs ont été identifiés (récepteurs GABAb et NO (oxide nitrique)) (Sakarya et al., 2007).

La plupart de ces analyses donnent des éléments parcellaires suggérant de manière indirecte la présence de cellules neurosensorielles, de neurotransmetteurs et d'un système de réception de

ces neurotransmetteurs. Seules des études combinant des expériences physiologiques, couplées à la localisation des neurotransmetteurs par immunohistochimie et à la recherche des éléments de leurs biosynthèses ou des gènes impliqués dans la formation des récepteurs pourront permettre une compréhension du système pré-nerveux des éponges (Nickel et Schiller, 2010).

C'est cette stratégie qui est actuellement en cours de développement dans notre équipe chez *Oscarella lobularis*. Pour cela divers travaux ont débuté en collaboration avec des équipes internationales, afin de tenter d'identifier et de caractériser les cellules neurosensorielles d'éponges, ce qui à plus long terme devrait permettre d'émettre des hypothèses sur les systèmes de conduction ancestraux chez les métazoaires.

# **B]** Identification du type cellulaire neurosensoriel ancestral

#### B.1 : Les choanocytes ?

Les choanocytes représentent un type cellulaire important des éponges, ayant un rôle bien établi dans des processus vitaux tels que la nutrition et la reproduction. Il est cependant intéressant de noter que les choanocytes (chez les éponges adultes) partagent des similarités, d'un point de vue morphologique, avec les structures sensorielles des eumétazoaires. En effet, les choanocytes présentent des similarités structurales (présence d'un flagelle ou cil entouré d'une collerette de microvillosités) avec certaines cellules sensorielles et tout particulièrement les mécanorécepteurs. De plus, l'organisation des choanocytes en chambres choanocytaires peut évoquer l'arrangement des cellules sensorielles en organes sensoriels (Jacobs *et al.*, 2007). Certains auteurs ont donc proposé que les cellules à collerette pourraient représenter l'ancêtre commun des cellules neurosensorielles (Jacobs *et al.*, 2007). Pour tester cette hypothèse audacieuse, il va être nécessaire de coupler plusieurs approches. Néanmoins, quelques résultats déjà acquis semblent apporter du poids à cette proposition :

- Comme montré précédemment, j'ai identifié et caractérisé le profil d'expression d'un facteur de transcription de la super famille ANTP exprimé uniquement dans ce type cellulaire (Gazave *et al.*, 2008). Ce gène *NK* a des affinités (bien que peu robustes) avec les *NK*<sub>6/7</sub>, ces derniers étant impliqués dans la formation des cellules neurosensorielles chez les bilatériens.
- Les premiers résultats obtenus *via* l'étude de la voie Notch chez *Oscarella lobularis* semblent montrer une possible localisation de la protéine Notch active dans les noyaux des choanocytes. Or, comme nous l'avons vu dans le chapitre V, la voie Notch est fortement impliquée dans la mise en place du système nerveux. De plus, l'étude de cette voie chez la démosponge *Amphimedon queenslandica* a fortement suggéré que le système neurogénique des bilatériens impliquant les gènes *Notch, Delta* et *bHLH* était fonctionnel chez les éponges et qu'il servait vraisemblablement à la différenciation d'un type cellulaire sensoriel (Richards *et al.*, 2008).



Figure 52 : (A) Résultats préliminaires d'immunohistochimie, obtenus par le Dr. Olga Raitkova, montrant la localisation de la sérotonine (en rose) dans les choanocytes d'*O*. *lobularis*. Les noyaux des choanocytes sont marqués au DAPI. (B) Schéma précisant la localisation de la sérotonine à la base de la collerette du choanocyte (expertise A. Ereskovsky).

- Dans l'optique précédemment évoquée de ne pas se limiter à la recherche de gènes, la • recherche de neurotransmetteurs chez O. lobularis a été initiée. Un projet de collaboration franco-russe (PICS) a été développé ces derniers mois et vient d'être accepté. Dans ce cadre, l'étude de l'origine du système nerveux (via l'utilisation du modèle éponge Oscarella lobularis) sera développée en collaboration avec des chercheurs du Zoological Institute RAS de St Petersbourg. La première partie de ce projet vise à rechercher des neurotransmetteurs et notamment la sérotonine, et pour cela, des expériences d'immunohistochimie préliminaires ont été réalisées par les Dr. Olga Raitkova<sup>11</sup> et Anatoly Petrov<sup>12</sup>. Les premiers résultats montrent une localisation de l'anticorps anti-sérotonine (non-spécifique) dans la partie apicale des choanocytes (Figure 52A et B). Ces résultats confirment les études précédentes montrant la présence de sérotonine chez les éponges (Weyrer et al., 1999).
- Dans une étude précédente chez la démosponge Chondrilla nucula, les auteurs localisent un neurotransmetteur (Gamma-amino butyric acid = GABA) principalement dans les choanocytes (Ramoino et al., 2007). Cependant, la localisation ne se limite pas à ce type cellulaire : les pinacocytes (exo- et endo-) et quelques archæocytes sont également marqués, laissant suggérer que les choanocytes ne seraient peut-être pas le seul type cellulaire à assurer des fonctions neuro-sensorielles.

Ces quatre résultats semblent a priori cohérents avec l'hypothèse d'un éventuel rôle neurosensoriel des choanocytes. Néanmoins les deux derniers résultats basés sur des expériences d'immunohistochimie avec des anticorps non spécifiques restent à confirmer.

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> Zoological Institute RAS- St Petersbourg, Russie<sup>12</sup> Zoological Institute RAS- St Petersbourg, Russie

# B.2 : Cellules pigmentées, « flask » cells et cellules globulaires des larves

Chez les larves d'éponges, un certain nombre de cellules potentiellement neuro-sensorielles ont été envisagées :

#### B.2.1 : « Flask » cells vs cellules globulaires

L'expression de gènes post-synaptiques dans des « flask » cells de la larve d'*A. queenslandica* a permis aux auteurs de suggérer un potentiel rôle sensoriel de ces cellules (Sakarya *et al.*, 2007). Par la suite l'étude de la voie Notch chez la même espèce a laissé supposer une implication de cette voie dans la différenciation de cellules globulaires (Richards *et al.*, 2008). Les auteurs considèrent que ces cellules globulaires sont les mêmes que les « flask » cells de l'article précédent. Cependant, l'article de description des types cellulaires de la larve d'*A. queenslandica* ne définit aucunement les cellules globulaires (Leys et Degnan, 2001). L'absence d'échelle sur les photos représentant ces différentes cellules ne permet pas de vérifier cette information. Des doutes subsistent donc quant au fait que soit le même type cellulaire marqué à la fois par les gènes post-synaptiques et neurogéniques.

#### **B.2.2 : Cellules pigmentées**

Les gènes à homéoboîtes *LIM* sont des facteurs de transcription fortement conservés au cours de l'évolution. Il existe trois gènes *LIM* dans le génome d'*Amphimedon queenslandica* appartenant à trois des six sous-familles majeures qui sont spécifiques des métazoaires (Hobert et Westphal, 2000 ; Wiens *et al.*, 2003 ; Larroux *et al.*, 2006 ; Larroux *et al.*, 2008 ; Srivastava *et al.*, in press). Chez les bilatériens, ces gènes *LIM* sont fortement impliqués dans la mise en place du système nerveux, notamment dans la spécification des motoneurones et des neurones sensoriels (Hobert et Westphal, 2000). Les premières études d'expression de ces gènes *LIM* chez les éponges ont montré une possible implication de ce gène dans la formation de cellules photosensibles situées au niveau de l'anneau pigmenté de la larve (Leys et Degnan, 2001 ; Leys *et al.*, 2002 ; Srivastava *et al.*, in press). Ces cellules avaient d'ailleurs

été déjà supposées neurosensorielles (Leys et Degnan, 2002).

*B.3* : *Perspectives pour l'identification des types cellulaires potentiellement neuro-sensoriels chez les éponges* 

#### B.3.1 : Familles de gènes d'intérêt particulier pour cette question

Comme nous l'avons déjà évoqué, l'étude des gènes *bHLH* chez d'autres éponges pourra certainement apporter des informations pour l'identification de cellules potentiellement neuro-sensorielles, une étude en ce sens chez *Oscarella lobularis* va débuter.

Les gènes *Sox* représentent également une famille importante de facteurs de transcription à homéoboîte HMG ayant divers rôles notamment dans la formation du SNC et périphérique des bilatériens (Guth et Wegner, 2008). Ils sont spécifiques des animaux et étaient déjà présents et diversifiés chez l'ancêtre commun des métazoaires (Magie *et al.*, 2005 ; Jager *et al.*, 2006 ; Jager *et al.*, 2008). En effet quatre gènes *Sox* différents ont été identifiés chez plusieurs espèces d'éponges (Jager *et al.*, 2006 ; Larroux *et al.*, 2006 ; Larroux *et al.*, 2008). Leur implication potentielle dans la spécification des cellules sensorielles ciliées du cténophore *Pleurobrachia pileus* a été suggérée et leur étude chez les éponges mériterait d'être développée (Manuel, 2007 ; Jager *et al.*, 2008).

Les gènes *Six (sine oculis* homeobox) codent pour des facteurs de transcription possédant deux domaines protéiques conservés (un homéodomaine divergent et un domaine Six) (Kumar, 2009) et sont essentiels à la formation des yeux composés. Ainsi, ils agissent en synergie avec les gènes *Pax* pour permettre le développement des yeux chez les bilatériens (Kawakami *et al.*, 2000). Chez les bilatériens, ce sont les gènes *Pax6* qui interviennent préférentiellement dans la morphogenèse des yeux. Les cnidaires, bien que ne possédant pas de gène *Pax6*, présenteraient, malgré tout, des *Pax* assurant une fonction dans le développement du système photorécepteur : les gènes *PaxB(2/5/8)*. De plus, ces gènes *Pax2* et *Pax6* seraient issus d'un gène ancestral *PaxB-like* (Kozmik, 2008). Parallèlement, l'expression du gène *six1/2/sine oculis* localisée dans les rhopalia de méduses a permis de suggérer l'implication de ce gène dans la mise en place de structures sensorielles chez les



contractée (B) Profiles des contractions rythmiques intrinséques au cours du temps et induction des contractions lors de l'ajout de glutamate (indiqué par la flèche) d'*O.lobularis* (Nickel et Schiller, 2010).

cnidaires (Bebenek *et al.*, 2004). Chez les éponges des gènes *Six* et *Pax* ont été identifiés et plus précisément les gènes *Six1/2/sine oculis* et *PaxB(2/5/8)* (Hoshiyama *et al.*, 1998 ; Bebenek *et al.*, 2004 ; Hoshiyama *et al.*, 2007). Ainsi, il a été suggéré que les interactions génétiques entre ces deux familles de gènes soient déjà présentes chez l'ancêtre commun des métazoaires (Hoshiyama *et al.*, 2007). L'étude, chez les éponges, des patrons d'expression de ces gènes cruciaux pour la mise en place d'un système sensoriel, permettra sûrement d'affiner nos hypothèses sur les cellules neuro-sensorielles, notamment les photorécepteurs.

#### **B.3.2** : La recherche de neurotransmetteurs par immunolocalisation

Nous précisions précédemment l'intérêt de la recherche et de la localisation de neurotransmetteurs. Ceux-ci étant souvent des produits d'un métabolisme faisant intervenir plusieurs enzymes, l'unitilsation des ISH est limité et les expériences d'immunolocalisation doivent donc être développée et complétées. Par exemple, pour la sérotonine, qui est un dérivé du tryptophane, la voie métabolique qui permet sa synthèse nécessite deux enzymes : la tryptophane hydroxylase (TPH) et la L-aromatique AA décarboxylase. Des anticorps contre ces deux enzymes sont également disponibles et vont être testés. Si les marquages obtenus sont congruents, les neurotransmetteurs étant synthétisés au niveau des vésicules, cela pourrait conforter de manière indirecte la localisation de la sérotonine dans les choanocytes.

#### B.3.3 : L'approche physiologique : nécessité et difficulté

Toujours dans l'optique de réaliser des études intégrées pour essayer de résoudre la question de l'origine et de l'évolution des cellules neuro-sensorielles l'équipe a entrepris des études physiologiques chez *Oscarella lobularis*. Pour cela, une étude des contractions rythmiques endogènes et modulées par des substances chimiques a débuté (Figure 53 A-B).

En effet, de nombreuses éponges sont capables de se contracter, cependant, cette capacité de contraction n'a été démontrée que chez les démosponges (Ellwanger et Nickel, 2006 ; Ellwanger *et al.*, 2007). Afin de connaître les possibilités de contraction chez une éponge homoscléromorphe, une collaboration entre notre équipe et celle de Michael Nickel<sup>13</sup> a été

<sup>&</sup>lt;sup>13</sup> Laboratoire Porifera.net, Université de Jena, Allemagne



Figure 54 : (A) Conduction du signal hypothétique chez *Tethya wilhelma* de type paracrine (Ellwanger et Nickel, 2006). Un stimulus externe (1) est reçu par une cellule potentiellement sensorielle (gris), déclenchant l'émission d'une substance chimique (2) qui diffuse dans le mésohyle (gris clair) et induit la contraction (C!) des pinacocytes (bleus) contractiles *via* un récepteur spécifique. Eventuellement, les pinacocytes stimulés pourraient émettre une deuxième substance chimique (3) qui peut soit diffuser dans le mésohyle soit être libérée dans le système aquifère, permettant une accélération de la réaction de contraction (contrôlée par les cellules en rouge). (B): Origine des gènes post-synaptiques. Configuration possible des gènes post-synaptiques basée sur l'organisation connue de la jonction post-synaptique des bilatériens. Chaque couleur représente l'origine supposée du gène au cours de l'histoire des métazoaires sur la base d'un arbre phylogénétique consensus (Sakarya *et al.*, 2007)

mise en place. Christopher Arnold, étudiant en master, a été accueilli dans notre équipe durant l'été 2009 et a réalisé les premières expériences d'enregistrement des contractions intrinsèques chez *O. lobularis*. Il a également mis en évidence que l'ajout de neurotransmetteurs dans l'eau de mer, notamment le glutamate et le GABA, induisaient des contractions (Figure 53) (Nickel et Schiller, 2010). Ainsi les signaux chimiques sont reconnus par l'éponge et l'on peut donc supposer la présence de récepteurs GABA/glutamate chez *O. lobularis* (Nickel et Schiller, 2010). Cette étude reste préliminaire et devra être confirmée, et d'autres substances actives testées, notamment la sérotonine afin de pouvoir mettre enparallèle les résultats obtenus précédemment avec les anticorps chez *O. lobularis*.

### C] Evolution des systèmes de conduction : chimique vs électrique

Comme nous l'avons déjà vu, il existe deux principaux types de conduction de l'information: chimique et électrique. Le système de conduction chimique peut être lui-même de deux types différents, soit synaptique soit paracrine *via* la dispersion non synaptique de molécules chimiques.

### C.1 : Conduction chimique paracrine

Les résultats précédemment évoqués suggèrent fortement que des récepteurs spécifiques de divers neurotransmetteurs et que des systèmes de signalisation chimiques complexes, probablement de type paracrine sont présents chez les éponges (Figure 54A) (Ellwanger et Nickel, 2006). Il semblerait qu'il soit antérieur au système synaptique (Nickel et Schiller, 2010). Cependant ce système paracrine présente un inconvénient majeur : le temps nécessaire à la diffusion limite la vitesse de réaction. Ainsi, les processus diffusifs ne permettent pas de rendre compte de la rapidité de réponse observée chez les éponges, laissant supposer la présence potentielle d'un système synaptique non encore découvert.



Figure 55: (A) Illustration de prénombreux éléments synaptiques des bilatériens, dont la synaptotagmine. (B) Comparaison des 2 scénarios évolutifs pour l'apparition du SN. (A) Hypothèse neuro-musculaire : des cellules épithéliales (e) à potentialité électrique migrent à l'intérieur et évoluent en protoneurones(AP) qui conduisent l'excitation nerveuse des cellules épithéliales cellules aux musculaires (orange) via des synapses (S). (B) Hypothèse de transition entre systèmes paracrine synaptique. Des signaux et paracrines de deux types chez les unicellulaires sont incorporés chez l'ancêtre commun des métazoaires. De nouveaux types cellulaires (cellules multipolaires) apparaissent et éventuellement un potentiel d'action. La sécrétion des messagers est restreinte à une partie de la cellule. Ces cellules polarisées et compartimentalisées évoluent en cellules neurosensorielles et neurones. Les synapses chimiques et électriques apparaissent (Nickel et Schiller, 2010).
#### *C.2* : *Conduction chimique synaptique*

La synapse est une structure complexe composée de nombreux éléments, dont les protéines post-synaptiques. Le noyau de ce complexe post-synaptique est la densité post-synaptique (PSD), une région membranaire dense aux électrons, spécialisée dans la signalisation et la plasticité et composée de nombreuses protéines à domaines PDZ (PSD-95/DLG/Zo-1) (Sakarya et al., 2009). Bien qu'une analyse protéomique complète de cette région PSD n'ait pas été réalisée, il a été mis en évidence la présence de 77 à 1000 protéines chez divers organismes (Sakarya et al., 2007). Cette région PSD est ainsi composée de protéines d'adhésion cellulaire et de cytosquelette, de protéines impliquées dans la formation des canaux ioniques et des récepteurs et de protéines impliquées dans l'échafaudage de la structure synaptique et dans la signalisation (Ryan et Grant, 2009). Une étude chez la démosponge Amphimedon queenslandica du répertoire de gènes de la région PSD a révélé la présence d'un grand nombre de gènes homologues à ceux de vertébrés (Figure 54B), alors que la plupart sont absents chez les plantes et les fungi (Sakarya et al., 2007). De plus la composition et l'arrangement en domaines de ces protéines sont grandement conservés. La structure tertiaire des domaines de liaison entre protéines étant conservée, on peut donc envisager que ces protéines soient capables de s'assembler pour former un échafaudage soussynaptique complet, permettant la stabilisation des récepteurs à neurotransmetteurs (Sakarya et al., 2007). Les études d'expression de cinq gènes post-synaptiques (DLG, HOMER, GRIP, CRIPT et GKAP) chez la démosponge ont révélé une expression localisée dans des cellules spécifiques les « flask cells» ou cellules globulaires d'après Richards et al., 2008. Cependant, le répertoire post-synaptique chez la démosponge n'est pas complet, en effet, les gènes codant pour certains récepteurs (iGluR, neuroligine...) et des gènes codant pour les canaux à potassium sont absents (Sakarya et al., 2007). Ainsi, il manque a priori chez la démosponge des gènes codant pour des récepteurs et des canaux qui sont essentiels à la transduction du signal pré-synaptique chez les eumétazoaires (Kosik, 2009). On ne peut, cependant exclure que ce complexe bien qu'incomplet puisse être fonctionnel chez les éponges. Les éléments pré-synaptiques ont été peu recherchés jusqu'à maintenant mais il semblerait qu'un bon nombre d'entre eux soient également conservés à l'échelle des métazoaires, tels que la synaptotagmine qui est impliquée dans l'exocytose des vésicules synaptiques (Figure 55A) (Kosik, 2009; Craxton, 2010). Ainsi, l'origine des synapses est fortement débattue et certains

auteurs considèrent que la synapse serait apparue avant le neurone, les neurones étant définis par des connections synaptiques (Ryan *et al.*, 2007). Cependant, bien qu'un proto-complexe post-synaptique fonctionnel ait été probablement présent chez l'ancêtre commun des métazoaires sa fonction ancestrale n'était pas forcément associée à une fonction synaptique.

Malgré ces limites, ces résultats récemment obtenus chez les éponges ont permis de proposer deux scénarios évolutifs pour l'émergence du système nerveux et des systèmes de conduction (Figure 55B) (Nickel et Schiller, 2010). (i) L'hypothèse neuro-musculaire, basée sur l'introgression progressive de cellules myoépithéliales qui vont donner naissance aux cellules neurosensorielles (Figure 55B-A) (Arendt, 2008 ; Nickel et Schiller, 2010). (ii) L'hypothèse de transition depuis un système paracrine dominant vers un

électrochimique dominant, basée sur l'évolution d'une communication chimique de type paracrine ancestrale à une communication de type synaptique électrochimique (Figure 55B-B) (Nickel et Schiller, 2010).

#### *C.3* : *Conduction électrique*

Le deuxième type de communication synaptique, n'est pas uniquement chimique mais plus précisément électrochimique. En effet, il implique la propagation d'un potentiel d'action. Nous avons vu que les synapses n'ont pas été caractérisées chez les éponges, bien que des gènes codant pour des éléments pré- et post-synaptiques aient été identifiés. Cependant, la présence d'un potentiel d'action chez une hexactinellide (Rhabdocalyptus dawsoni) a été prouvée (Leys et Mackie, 1997 ; Leys et al., 1999 ; Leys et Meech, 2006). Dans les autres lignées d'éponges, ces impulsions électriques n'ont pas été mises en évidence (démosponges et calcaires) (Nickel et Schiller, 2010) ou non testées (homoscléromorphes). En effet, la diffusion d'un potentiel d'action uniquement chez les hexactinellides pourrait être liée à l'absence de membranes cellulaires chez ces éponges dont les tissus sont organisés en syncytium (Leys et al., 2007). Les techniques électrophysiologiques ne sont pas disponibles à l'heure actuelle chez les démosponges, mais récemment, la caractérisation du répertoire génétique associé aux canaux ioniques (Kir et PMCA) a permis de démontrer la conservation de structure et de fonction de ce canal ionique chez les animaux (Tompkins-Macdonald et al., 2009). Les caractéristiques physiologiques de ce canal sont compatibles avec un maintien de la dépolarisation de la membrane. Ainsi, certaines membranes de démosponges pourraient

être capables de signalisation électrochimique, suggérant ainsi que la conduction électrique pourrait également avoir été déja présente chez l'ancêtre commun des métazoaires.

En conclusion, l'étude de l'évolution des types cellulaires chez les animaux n'en est qu'à ses balbutiements. Cependant, les résultats acquis au cours de cette thèse, associés à diverses études englobant un champ disciplinaires plus large, permettent d'avoir une meilleure vision sur l'origine de la cellule neuro-sensorielle. Ainsi, il apparaît clairement que les types cellulaires ancestraux aient pu avoir de multiples fonctions. On peut raisonnablement envisager aujourd'hui que si la cellule spécialisée qu'est le neurone a pu apparaître secondairement dans l'histoire des animaux, des conductions chimiques (*via* des neurotransmetteurs) impliquant vraisemblablement des structures de type synaptique, voire des conductions électrochimiques, étaient déjà présentes chez l'ancêtre commun des métazoaires. La spécialisation secondaire des types cellulaires (dont le neurone) n'est sans doute pas étrangère à la diversification de certains gènes impliqués dans la détermination des devenirs cellulaires (Arendt, 2008). Dans les années à venir, la synapse deviendra-t-elle, à l'instar du neurone, l'élément considéré comme primordial/minimal pour définir le système nerveux des métazoaires ?

## RÉFÉRENCES

Abedin, M., King, N. 2008. The premetazoan ancestry of cadherins. *Science* 319, 946-948.

- Adamska, M., Degnan, S. M., Green, K. M., Adamski, M., Craigie, A., Larroux, C., Degnan, B. M. 2007. Wnt and TGF-beta expression in the sponge Amphimedon queenslandica and the origin of metazoan embryonic patterning. *PLoS ONE* 2, e1031.
- Adell, T., Grebenjuk, V. A., Wiens, M., Müller, W. E. 2003a. Isolation and characterization of two T-box genes from sponges, the phylogenetically oldest metazoan taxon. *Development genes and evolution* 213, 421-434.
- Adell, T., Nefkens, I., Müller, W. E. 2003b. Polarity factor 'Frizzled' in the demosponge Suberites domuncula: identification, expression and localization of the receptor in the epithelium/pinacoderm(1). *FEBS letters* 554, 363-368.
- Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N., de Rosa, R. 1999. Animal evolution. The end of the intermediate taxa? *Trends in Genetics* 15, 104-108.
- Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N., Lespinet, O., Prud'homme, B., de Rosa, R. 2000. The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4453-4456.
- Aguinaldo, A. M., Turbeville, J. M., Linford, L. S., Rivera, M. C., Garey, J. R., Raff, R. A., Lake, J. A. 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 387, 489-493.
- Alie, A., Manuel, M. 2010. The backbone of the post-synaptic density originated in a unicellular ancestor of choanoflagellates and metazoans. *BMC evolutionary biology* 10, 34.
- Amiel, A. 2008. Thèse de doctorat. Apports du Modèle Cnidaire : Clytia hemisphaerica sur l'Origine de la Polarité Primaire de l'Ovocyte et sur L'Étude du Rôle de la Kinase Mos dans la Régulation de la Maturation Méiotique. Biologie du Développement, Biologie Cellulaire et Moléculaire. Université Pierre et Marie Curie, Villefranche-sur-Mer.
- Amiel, A., Houliston, E. 2009. Three distinct RNA localization mechanisms contribute to oocyte polarity establishment in the cnidarian *Clytia hemisphaerica*. *Developmental biology* 327, 191-203.
- Anderson, P. A. 1985. Physiological of a bidirectional, excitatory, chemical synapse. *Journal* of Neurophysiology 53, 821-835.
- Anderson, P. A. V. 2004. Cnidarian neurobiology: what does the future hold ? *Hydrobiologia* 530, 107-116.
- Arendt, D. 2008. The evolution of cell types in animals: emerging principles from molecular studies. *Nature reviews* 9, 868-882.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., Fortini, M. E. 1995. Notch signaling. *Science* 268, 225-232.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., Lake, R. J. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770-776.
- Azevedo, F., Hajdu, E., Willenz, F., Klautau, M. 2009. New records of Calcareous sponges (Porifera, Calcarea) from the Chilean coast. *Zootaxa*, 1-30.
- Baldauf, S. L. 2003. The deep roots of eukaryotes. Science 300, 1703-1706.
- Ball, E. E., Hayward, D. C., Saint, R., Miller, D. J. 2004. A simple plan--cnidarians and the origins of developmental mechanisms. *Nature reviews* 5, 567-577.
- **Banerjee-Basu, S., Baxevanis, A. D.** 2001. Molecular evolution of the homeodomain family of transcription factors. *Nucleic acids research* 29, 3258-3269.
- **Barolo, S., Posakony, J. W.** 2002. Three habits of highly effective signaling pathways: principles of transcriptional control by developmental cell signaling. *Genes & development* 16, 1167-1181.

- Baurain, D., Brinkmann, H., Philippe, H. 2007. Lack of resolution in the animal phylogeny: closely spaced cladogeneses or undetected systematic errors? *Molecular biology and evolution* 24, 6-9.
- Bebenek, I. G., Gates, R. D., Morris, J., Hartenstein, V., Jacobs, D. K. 2004. sine oculis in basal Metazoa. *Development genes and evolution* 214, 342-351.
- Bertrand, N., Castro, D. S., Guillemot, F. 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nature Reviews Neuroscience* 3, 517-530.
- Bharathan, G., Janssen, B. J., Kellogg, E. A., Sinha, N. 1997. Did homeodomain proteins duplicate before the origin of angiosperms, fungi, and metazoa? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 13749-13753.
- Blackstone, N. W. 2009. A new look at some old animals. PLoS biology 7, e7.
- Bland, C., Rand, M. D. 2006. Methylmercury induces activation of Notch signaling. *Neurotoxicology* 27, 982-991.
- Borchiellini, C. 2007. Habilitation à diriger des recherches. Marseille.
- Borchiellini, C., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Le Parco, Y. 1998. Phylogenetic analysis of the Hsp70 sequences reveals the monophyly of Metazoa and specific phylogenetic relationships between animals and fungi. *Molecular biology and evolution* 15, 647-655.
- Borchiellini, C., Chombard, C., Manuel, M., Alivon, E., Vacelet, J., Boury-Esnault, N. 2004. Molecular phylogeny of Demospongiae: implications for classification and scenarios of character evolution. *Molecular phylogenetics and evolution* 32, 823-837.
- Borchiellini, C., Manuel, M., Alivon, E., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Le Parco, Y. 2001. Sponge paraphyly and the origin of Metazoa. *Journal of Evolutionary Biology* 14, 171-179.
- Bosch, T. C. 2004. Control of asymmetric cell divisions: will enidarians provide an answer? *Bioessays* 26, 929-931.
- **Bouissac, J.** 2005. Thèse de doctorat. Rôle de la voie Notch dans la spécification des cellules souches neurales et dans la différenciation des précurseurs neuraux. Utilisation du système modèle des neurosphères. Sciences du vivant aspects moléculaires et cellulaires de la biologie, spécialité neurosciences. *Louis Pasteur*, Strasbourg.
- Boury-Esnault, N., Ereskovsky, A. V., Bezac, C., Tokina, D. B. 2003. Larval development in Homoscleromorpha (Porifera, Demospongiae). *Invertebrate Biology* 122, 187-202.
- Boury-Esnault, N., Muricy, G., Gallissian, M. F., Vacelet, J. 1995. Sponges without skeleton: a new Mediterranean genus of Homoscleromorpha (Porifera, Demospongiae). Ophelia 43, 25-43.
- Boury-Esnault, N., Rützler, K. (Eds.) 1997. Thesaurus of Sponge Morphology. *Smithsonian Institution Press*, Washington, D.C.
- Boute, N., Exposito, J. Y., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Noro, N., Miyazaki, K., Yoshizato, K., Garrone, R. 1996. Type IV collagen in sponges, the missing link in basement membrane ubiquity. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 88, 37-44.
- Bray, S. 1998a. A Notch affair. Cell 93, 499-503.
- Bray, S. 1998b. Notch signalling in Drosophila: three ways to use a pathway. *Seminar in Cell and Developmental Biology* 9, 591-597.
- Bray, S. 2000. Notch. Current Biology 10, R433-435.
- Bray, S. J. 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature Review Molecular Cell Biology* 7, 678-689.
- Brenner, E. D., Stahlberg, R., Mancuso, S., Vivanco, J., Baluska, F., Van Volkenburgh,
   E. 2006. Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling. *Trends in Plant Science* 11, 413-419.

Brooke, N. M., Holland, P. W. 2003. The evolution of multicellularity and early animal genomes. *Current Opinion in Genetics and Development* 13, 599-603.

Brusca, R. C., Brusca, G. J. (Eds.) 2003. Invertebrates Sinauer Associates, Inc., Sunderland.

- Bullock, T. H., Horridge, G. A. (Eds.) 1965. Structure and function in the nervous system of invertebrates. *Freeman and Co*, San Francisco and London.
- **Castresana, J.** 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular biology and evolution* 17, 540-552.
- Cau, E., Blader, P. 2009. Notch activity in the nervous system: to switch or not switch? *Neural Development* 4, 36.
- Chiori, R., Jager, M., Denker, E., Wincker, P., Da Silva, C., Le Guyader, H., Manuel, M., Queinnec, E. 2009. Are Hox genes ancestrally involved in axial patterning? Evidence from the hydrozoan *Clytia hemisphaerica* (Cnidaria). *PLoS ONE* 4, e4231.
- Chourrout, D., Delsuc, F., Chourrout, P., Edvardsen, R. B., Rentzsch, F., Renfer, E., Jensen, M. F., Zhu, B., de Jong, P., Steele, R. E., Technau, U. 2006. Minimal ProtoHox cluster inferred from bilaterian and cnidarian Hox complements. *Nature* 442, 684-687.
- Collins, A. G. C., P.; McFadden C.S., Schierwater, B. 2005. Phylogenetic context and basal metazoan model systems. *Integrative and comparative biology* 45, 585-594.
- **Craxton, M.** 2010. A manual collection of Syt, Esyt, Rph3a, Rph3al, Doc2, and Dblc2 genes from 46 metazoan genomes an open access resource for neuroscience and evolutionary biology. *BMC genomics* 11, 37.
- Crotty, D. A., Gann, A. (Eds.) 2009. Emerging model organisms A laboratory manual *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New-York.
- Custodio, M. R., Prokic, I., Steffen, R., Koziol, C., Borojevic, R., Brummer, F., Nickel, M., Muller, W. E. 1998. Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge Suberites domuncula: a model system for studies of cell proliferation and cell death. Mechanisms of ageing and development 105, 45-59.
- **Da Silva, F. B., Muschner, V. C., Bonatto, S. L.** 2007. Phylogenetic position of Placozoa based on large subunit (LSU) and small subunit (SSU) rRNA genes. *Genetics and Molecular Biology* 30, 127-132.
- Darling, J. A., Reitzel, A. R., Burton, P. M., Mazza, M. E., Ryan, J. F., Sullivan, J. C., Finnerty, J. R. 2005. Rising starlet: the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis*. *Bioessays* 27, 211-221.
- Davidson, E. H., Erwin, D. H. 2006. Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science (New York, N.Y* 311, 796-800.
- De Robertis, E. M. 2008. Evo-Devo: Variations on Ancestral Themes. Cell 132, 185-195.
- Degnan, B. M., Adamska, M., Craigie, A., Degnan, S. M., Fahey, B., Gauthier, M., Hooper, J. N. A., Larroux, C., Leys, S., Lovas, E., Richards, G. S. (Eds.) 2009a. The Demosponge *Amphimedon queenslandica*. Reconstructing the ancestral metazoan genome and deciphering the origin of animal multicellularity. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- Degnan, B. M., Vervoort, M., Larroux, C., Richards, G. S. 2009b. Early evolution of metazoan transcription factors. *Current Opinion in Genetics and Development* 19, 1-9.
- Dellaporta, S. L., Xu, A., Sagasser, S., Jakob, W., Moreno, M. A., Buss, L. W., Schierwater, B. 2006. Mitochondrial genome of *Trichoplax adhaerens* supports placozoa as the basal lower metazoan phylum. *Proceedings of the National Academy* of Sciences of the United States of America 103, 8751-8756.
- **Delsuc, F., Brinkmann, H., Philippe, H.** 2005. Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nature reviews* 6, 361-375.

- Denes, A. S., Jekely, G., Steinmetz, P. R., Raible, F., Snyman, H., Prud'homme, B., Ferrier, D. E., Balavoine, G., Arendt, D. 2007. Molecular architecture of annelid nerve cord supports common origin of nervous system centralization in bilateria. *Cell* 129, 277-288.
- **Denker, E.** 2008. Thèse de doctorat. Développement et évolution des cellules neurosensorielles chez les cnidaires : apports de l'étude de la nématogenèse de la méduse de *Clytia hemisphaerica*. Biologie du développement, Biologie évolutive. *Université Paris VI, Pierre et Marie Curie*, Paris.
- Denker, E., Chatonnet, A., Rabet, N. 2008a. Acetylcholinesterase activity in *Clytia hemisphaerica* (Cnidaria). *Chem Biol Interact* 175, 125-128.
- Denker, E., Manuel, M., Leclere, L., Le Guyader, H., Rabet, N. 2008b. Ordered progression of nematogenesis from stem cells through differentiation stages in the tentacle bulb of *Clytia hemisphaerica* (Hydrozoa, Cnidaria). *Developmental biology* 315, 99-113.
- **Derelle, R.** 2007. Thèse de doctorat. L'apport des Cténaires à la compréhension de l'évolution des Métazoaires : positionnement par la phylogénomique et recherche de gènes de développement chez *Pleurobrachia pileus*. Diversité du Vivant. *Université Pierre et Marie Curie Paris VI*, Paris.
- Derelle, R., Lopez, P., Le Guyader, H., Manuel, M. 2007. Homeodomain proteins belong to the ancestral molecular toolkit of eukaryotes. *Evolution & development* 9, 212-219.
- **Derelle, R., Manuel, M.** 2007. Ancient connection between NKL genes and the mesoderm? Insights from Tlx expression in a ctenophore. *Development genes and evolution* 217, 253-261.
- **DeSalle, R., Schierwater, B.** 2008. An even "newer" animal phylogeny. *Bioessays* 30, 1043-1047.
- Dewel, R. A. 2000. Colonial origin for Emetazoa: major morphological transitions and the origin of bilaterian complexity. *Journal of Morphology* 243, 35-74.
- Diaz, M. C., Van Soest, R. W. M. (Eds.) 1994. The Plakinidae: a systematic review. A.A. Balkema, Rotterdam.
- **Dohrmann, M., Janussen, D., Reitner, J., Collins, A. G., Worheide, G.** 2008. Phylogeny and evolution of glass sponges (porifera, hexactinellida). *Systematic biology* 57, 388-405.
- **Dohrmann, M., Voigt, O., Erpenbeck, D., Worheide, G.** 2006. Non-monophyly of most supraspecific taxa of calcareous sponges (Porifera, Calcarea) revealed by increased taxon sampling and partitioned Bayesian analysis of ribosomal DNA. *Molecular phylogenetics and evolution* 40, 830-843.
- Dovey, H. F., John, V., Anderson, J. P., Chen, L. Z., de Saint Andrieu, P., Fang, L. Y., Freedman, S. B., Folmer, B., Goldbach, E., Holsztynska, E. J., Hu, K. L., Johnson-Wood, K. L., Kennedy, S. L., Kholodenko, D., Knops, J. E., Latimer, L. H., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I. M., Motter, R. N., Mutter, L. C., Nietz, J., Quinn, K. P., Sacchi, K. L., Seubert, P. A., Shopp, G. M., Thorsett, E. D., Tung, J. S., Wu, J., Yang, S., Yin, C. T., Schenk, D. B., May, P. C., Altstiel, L. D., Bender, M. H., Boggs, L. N., Britton, T. C., Clemens, J. C., Czilli, D. L., Dieckman-McGinty, D. K., Droste, J. J., Fuson, K. S., Gitter, B. D., Hyslop, P. A., Johnstone, E. M., Li, W. Y., Little, S. P., Mabry, T. E., Miller, F. D., Audia, J. E. 2001. Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. Journal of neurochemistry 76, 173-181.
- Dunn, C. W., Hejnol, A., Matus, D. Q., Pang, K., Browne, W. E., Smith, S. A., Seaver, E., Rouse, G. W., Obst, M., Edgecombe, G. D., Sorensen, M. V., Haddock, S. H., 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*.

- Edgar, R. C. 2004a. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics* 5, 113.
- Edgar, R. C. 2004b. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32, 1792-1797.
- Ellwanger, K., Eich, A., Nickel, M. 2007. GABA and glutamate specifically induce contractions in the sponge *Tethya wilhelma*. *Journal of Comparative Physiology A* 193, 1-11.
- Ellwanger, K., Nickel, M. 2006. Neuroactive substances specifically modulate rhythmic body contractions in the nerveless metazoon *Tethya wilhelma* (Demospongiae, Porifera). *Frontiers in Zoology* 3, 7.
- Ender, A., Schierwater, B. 2003. Placozoa are not derived cnidarians: evidence from molecular morphology. *Molecular biology and evolution* 20, 130-134.
- Ereskovsky, A. V., Borchiellini, C., Gazave, E., Ivanisevic, J., Lapebie, P., Perez, T., Renard, E., Vacelet, J. 2009. The Homoscleromorph sponge *Oscarella lobularis*, a promising sponge model in evolutionary and developmental biology. *Bioessays* 31, 89-97.
- Ereskovsky, A. V., Boury-Esnault, N. 2002. Cleavage pattern in *Oscarella* species (Porifera, Demospongiae, Homoscleromorpha), transmission of maternal cells and symbiotic bacteria. *Journal of Natural History* 36.
- Ereskovsky, A. V., Dondua, A. K. 2006. The problem of germ layers in sponges (Porifera) and some issues concerning early metazoan evolution. *Zoologischer Anzeiger* 245, 65-76.
- Ereskovsky, A. V., Tokina, D. B., Bézac, C., Boury-Esnault, N. 2007. Métamorphosis of Cinctoblastula larvae (Homoscleromorpha, Porifera). *Journal of Morphology* 268.
- Ereskovsky, T. 2006. Asexual reproduction in homoscleromorph sponges (Porifera; Homoscleromorpha). *Marine Biology* DOI 10.1007/s00227-006-0439-5.
- Exposito, J. Y., Larroux, C., Cluzel, C., Valcourt, U., Lethias, C., Degnan, B. M. 2008. 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. *The Journal of biological chemistry* 283, 28226-28235.
- Fahey, B., Larroux, C., Woodcroft, B. J., Degnan, B. M. 2008. Does the high gene density in the sponge NK homeobox gene cluster reflect limited regulatory capacity? *The Biological bulletin* 214, 205-217.
- Field, K. G., Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Ghiselin, M. T., Raff, E. C., Pace, N. R., Raff, R. A. 1988. Molecular phylogeny of the animal kingdom. *Science (New York, N.Y* 239, 748-753.
- Flores, G. V., Duan, H., Yan, H., Nagaraj, R., Fu, W., Zou, Y., Noll, M., Banerjee, U. 2000. Combinatorial signaling in the specification of unique cell fates. *Cell* 103, 75-85.
- Frank, U., Leitz, T., Muller, W. A. 2001. The hydroid *Hydractinia*: a versatile, informative cnidarian representative. *Bioessays* 23, 963-971.
- Galliot, B., Quiquand, M., Ghila, L., de Rosa, R., Miljkovic-Licina, M., Chera, S. 2009. Origins of neurogenesis, a cnidarian view. *Developmental biology* 332, 2-24.
- Galliot, B., Schmid, V. 2002. Cnidarians as a model system for understanding evolution and regeneration. *The International journal of developmental biology* 46, 39-48.
- Garcia-Fernandez, J. 2005a. The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nature reviews* 6, 881-892.

- Garcia-Fernandez, J. 2005b. Hox, ParaHox, ProtoHox: facts and guesses. *Heredity* 94, 145-152.
- Garm, A., Poussart, Y., Parkefelt, L., Ekstrom, P., Nilsson, D. E. 2007. The ring nerve of the box jellyfish *Tripedalia cystophora*. *Cell and tissue research* 329, 147-157.
- **Gauthier, M., Degnan, B. M.** 2008. The transcription factor NF-kappaB in the demosponge *Amphimedon queenslandica*: insights on the evolutionary origin of the Rel homology domain. *Development genes and evolution* 218, 23-32.
- Gazave, E., Lapebie, P., Renard, E., Bezac, C., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Perez, T., Manuel, M., Borchiellini, C. 2008. NK homeobox genes with choanocyte-specific expression in homoscleromorph sponges. *Development genes and evolution* 218, 479-489.
- Gazave, E., Lapebie, P., Richards, G. S., Brunet, F., Ereskovsky, A. V., Degnan, B. M., Borchiellini, C., Vervoort, M., Renard, E. 2009. Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genome. *BMC evolutionary biology* 9, 249.
- **Gehring, W. J.** 1985. The homeo box: a key to the understanding of development? *Cell* 40, 3-5.
- Geling, A., Steiner, H., Willem, M., Bally-Cuif, L., Haass, C. 2002. A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO reports* 3, 688-694.
- Gerhart, J. 1999. 1998 Warkany lecture: signaling pathways in development. *Teratology* 60, 226-239.
- Gilbert, S. F. (Ed. 2006. Developmental Biology, Eighth edition. Sinauer Associates.
- Graham, A. 2000. Animal phylogeny: root and branch surgery. Current Biology 10, R36-38.
- Grassé, P. (Ed. 1994. Traité de zoologie, anatomie, systématique, biologie. Masson.
- Grimmelikhuijzen, C. J., Graff, D., McFarlane, I. D. 1989. Neurones and neuropeptides in coelenterates. *Archives of Histology and Cytology* 52 Suppl, 265-278.
- Grimson, A., Srivastava, M., Fahey, B., Woodcroft, B. J., Chiang, H. R., King, N., Degnan, B. M., Rokhsar, D. S., Bartel, D. P. 2008. Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature*.
- Guillemot, F. 2007. Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development (Cambridge, England)* 134, 3771-3780.
- Guth, S. I., Wegner, M. 2008. Having it both ways: Sox protein function between conservation and innovation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65, 3000-3018.
- Hadrys, T., DeSalle, R., Sagasser, S., Fischer, N., Schierwater, B. 2005. The Trichoplax PaxB gene: a putative Proto-PaxA/B/C gene predating the origin of nerve and sensory cells. *Molecular biology and evolution* 22, 1569-1578.
- Haen, K. M., Lang, B. F., Pomponi, S. A., Lavrov, D. V. 2007. Glass sponges and bilaterian animals share derived mitochondrial genomic features: a common ancestry or parallel evolution? *Molecular biology and evolution* 24, 1518-1527.
- Halanych, K. M. 2004. The new view of animal phylogeny. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics 35, 549-555.
- Hall, T. A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser* 41, 95-98.
- Hedtke, S. M., Townsend, T. M., Hillis, D. M. 2006. Resolution of phylogenetic conflict in large data sets by increased taxon sampling. *Systematic biology* 55, 522-529.
- Hejnol, A., Obst, M., Stamatakis, A., Ott, M., Rouse, G. W., Edgecombe, G. D., Martinez, P., Baguna, J., Bailly, X., Jondelius, U., Wiens, M., Muller, W. E., Seaver, E., Wheeler, W. C., Martindale, M. Q., Giribet, G., Dunn, C. W. 2009.

Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences.* 

- Hennig, W. (Ed. 1950. Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik. *Deutscher Zentralverlag*, Berlin.
- Hennig, W. (Ed. 1966. Phylogenetic Systematics. University of Illinois Press, Urbana.
- Henry, J. Q., Martindale, M. Q. 2000. Regulation and regeneration in the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*. *Developmental biology* 227, 720-733.
- Henry, J. Q., Martindale, M. Q. 2004. Inductive interactions and embryonic equivalence groups in a basal metazoan, the ctenophore Mnemiopsis leidyi. *Evolution & development* 6, 17-24.
- Hernandez-Nicaise, M. L. 1973a. [The nervous system of ctenophores. I. Structure and ultrastructure of the epithelial nerve-nets]. Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie 137, 223-250.
- Hernandez-Nicaise, M. L. 1973b. [The nervous system of ctenophores. II. The nervous elements of the mesoglea of beroids and cydippids (author's transl)]. Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie 143, 117-133.
- Hernandez-Nicaise, M. L. 1973c. The nervous system of ctenophores. III. Ultrastructure of synapses. *Journal of Neurocytology* 2, 249-263.
- Hernandez-Nicaise, M. L. 1974. Ultrastructural evidence for a sensory-motor neuron in Ctenophora. *Tissue Cell* 6, 43-47.
- Hill, A., Tetrault, J., Hill, M. 2004. Isolation and expression analysis of a poriferan Antpclass Bar-/Bsh-like homeobox gene. *Development genes and evolution* 214, 515-523.
- Hill, D. P., Smith, B., McAndrews-Hill, M. S., Blake, J. A. 2008. Gene Ontology annotations: what they mean and where they come from. *BMC bioinformatics* 9 Suppl 5, S2.
- Hillis, D. M., Bull, J. J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic biology* 42.
- Hobert, O., Westphal, H. 2000. Functions of LIM-homeobox genes. *Trends in Genetics* 16, 75-83.
- Hoffmeister-Ullerich, S. A. 2007. *Hydra*--ancient model with modern outfit. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64, 3012-3016.
- Holstein, T. W., Hobmayer, E., Technau, U. 2003. Cnidarians: an evolutionarily conserved model system for regeneration? *Developmental Dynamics* 226, 257-267.
- Hooper, J. N., Van Soest, R. W. M., Debrenne, F. (Eds.) 2002. Phylum Porifera Grant, 1836; Systema Porifera: A Guide to the classification of Sponges. *Kluwer* Academic/Plenum Publishers, New York.
- Hooper, J. N. A., van Soest, R. W. M. (Eds.) 2002. Class Demospongiae Sollas, 1885, Systema Porifera: A Guide to the classification of Sponges. *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, New York.
- Hooper, J. N. A., Van Soest, R. W. M. 2006. A new species of *Amphimedon* (Porifera, Demospongiae, Haplosclerida, Niphatidae) from the Capricorn-Bunker Islands, Great Barrier Reef, Australia: target species for the 'sponge genome project'. *Zootaxa*, 31-39.
- Hoshiyama, D., Iwabe, N., Miyata, T. 2007. Evolution of the gene families forming the Pax/Six regulatory network: isolation of genes from primitive animals and molecular phylogenetic analyses. *FEBS letters* 581, 1639-1643.
- Hoshiyama, D., Suga, H., Iwabe, N., Koyanagi, M., Nikoh, N., Kuma, K., Matsuda, F., Honjo, T., Miyata, T. 1998. Sponge Pax cDNA related to Pax-2/5/8 and ancient gene duplications in the Pax family. *Journal of molecular evolution* 47, 640-648.

- Huelsenbeck, J., Rannala, B. 2004. Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. *Systematic biology* 53, 904-913.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics (Oxford, England)* 17, 754-755.
- Hyman, L. H. 1940. The Invertebrates, Vol1: Protozoa through Ctenophora. In: McGraw-Hill (Ed.).
- Jacobs, D. K., Nakanishi, N., Yuan, D., Camara, A., Nichols, S. A., Hartenstein, V. 2007. Evolution of sensory structures in basal metazoa. *Integrative and comparative biology* 47, 712-723.
- Jager, M., Queinnec, E., Chiori, R., Le Guyader, H., Manuel, M. 2008. Insights into the early evolution of *SOX* genes from expression analyses in a ctenophore. *Journal of experimental zoology. Part B.*
- Jager, M., Queinnec, E., Houliston, E., Manuel, M. 2006. Expansion of the *SOX* gene family predated the emergence of the Bilateria. *Molecular phylogenetics and evolution* 39, 468-477.
- Jakob, W., Schierwater, B. 2007. Changing hydrozoan bauplans by silencing Hox-like genes. *PLoS ONE* 2, e694.
- Jenner, R. A. 2000. Evolution of animal body plans: the role of metazoan phylogeny at the interface between pattern and process. *Evolution & development* 2, 208-221.
- Jenner, R. A. 2004. Libbie Henrietta Hyman (1888-1969): from developmental mechanics to the evolution of animal body plans. *Journal of experimental zoology. Part B* 302, 413-423.
- Jenner, R. A. 2006. Unburdening evo-devo: ancestral attractions, model organisms, and basal baloney. *Development genes and evolution* 216, 385-394.
- Jenner, R. A., Wills, M. A. 2007. The choice of model organisms in evo-devo. *Nature* reviews 8, 311-319.
- Kamm, K., Schierwater, B. 2006. Ancient complexity of the non-Hox ANTP gene complement in the anthozoan *Nematostella vectensis*: implications for the evolution of the ANTP superclass. *Journal of experimental zoology. Part B* 306, 589-596.
- Kamm, K., Schierwater, B., Jakob, W., Dellaporta, S. L., Miller, D. J. 2006. Axial patterning and diversification in the cnidaria predate the Hox system. *Current Biology* 16, 920-926.
- Kasbauer, T., Towb, P., Alexandrova, O., David, C. N., Dall'armi, E., Staudigl, A., Stiening, B., Bottger, A. 2007. The Notch signaling pathway in the cnidarian *Hydra*. *Developmental biology* 303, 376-390.
- Kawakami, K., Sato, S., Ozaki, H., Ikeda, K. 2000. Six family genes--structure and function as transcription factors and their roles in development. *Bioessays* 22, 616-626.
- **Kerner, P.** 2009. Thèse de doctorat. Etude de l'évolution du système nerveux chez les animaux: neurogenèse comparative et phylogénomique. Biologie cellulaire et moléculaire du développement. *Paris-Sud XI* Paris.
- Khalturin, K., Anton-Erxleben, F., Milde, S., Plotz, C., Wittlieb, J., Hemmrich, G., Bosch, T. C. 2007. Transgenic stem cells in *Hydra* reveal an early evolutionary origin for key elements controlling self-renewal and differentiation. *Developmental biology* 309, 32-44.
- King, N. 2004. The unicellular ancestry of animal development. *Developmental cell* 7, 313-325.
- King, N., Westbrook, M. J., Young, S. L., Kuo, A., Abedin, M., Chapman, J., Fairclough, S., Hellsten, U., Isogai, Y., Letunic, I., Marr, M., Pincus, D., Putnam,

N., Rokas, A., Wright, K. J., Zuzow, R., Dirks, W., Good, M., Goodstein, D., Lemons, D., Li, W., Lyons, J. B., Morris, A., Nichols, S., Richter, D. J., Salamov, A., Sequencing, J. G., Bork, P., Lim, W. A., Manning, G., Miller, W. T., McGinnis, W., Shapiro, H., Tjian, R., Grigoriev, I. V., Rokhsar, D. 2008. The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature* 451, 783-788.

- Koizumi, O., Itazawa, M., Mizumoto, H., Minobe, S., Javois, L. C., Grimmelikhuijzen,
  C. J., Bode, H. R. 1992. Nerve ring of the hypostome in *hydra*. I. Its structure, development, and maintenance. *Journal of Computational Neurology* 326, 7-21.
- Kopan, R., Ilagan, M. X. 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137, 216-233.
- Kornprobst, J. M. (Ed. 2005. Spongiaires (Eponges). Lavoisier, Paris.
- Kortschak, R. D., Samuel, G., Saint, R., Miller, D. J. 2003. EST analysis of the cnidarian *Acropora millepora* reveals extensive gene loss and rapid sequence divergence in the model invertebrates. *Current Biology* 13, 2190-2195.
- Kosik, K. S. 2009. Exploring the early origins of the synapse by comparative genomics. *Biology Letters* 5, 108-111.
- Kozmik, Z. 2008. The role of *Pax* genes in eye evolution. *Brain research bulletin* 75, 335-339.
- Kumar, J. P. 2009. The sine oculis homeobox (SIX) family of transcription factors as regulators of development and disease. *Cell Mol Life Sci* 66, 565-583.
- Lai, E. C. 2004. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* (*Cambridge, England*) 131, 965-973.
- Lapebie, P., Gazave, E., Ereskovsky, A., Derelle, R., Bezac, C., Renard, E., Houliston, E., Borchiellini, C. 2009. WNT/beta-catenin signalling and epithelial patterning in the homoscleromorph sponge Oscarella. PLoS ONE 4, e5823.
- Larroux, C., Fahey, B., Degnan, S. M., Adamski, M., Rokhsar, D. S., Degnan, B. M. 2007. The NK homeobox gene cluster predates the origin of Hox genes. *Current Biology* 17, 706-710.
- Larroux, C., Fahey, B., Liubicich, D., Hinman, V. F., Gauthier, M., Gongora, M., Green, K., Worheide, G., Leys, S. P., Degnan, B. M. 2006. Developmental expression of transcription factor genes in a demosponge: insights into the origin of metazoan multicellularity. *Evolution & development* 8, 150-173.
- Larroux, C., Luke, G. N., Koopman, P., Rokhsar, D. S., Shimeld, S. M., Degnan, B. M. 2008. Genesis and expansion of metazoan transcription factor gene classes. *Molecular biology and evolution* 25, 980-996.
- Lartillot, N., Philippe, H. 2004. A Bayesian mixture model for across-site heterogeneities in the amino-acid replacement process. *Molecular biology and evolution* 21, 1095-1109.
- Lavrov, D. V., Wang, X., Kelly, M. 2008. Reconstructing ordinal relationships in the Demospongiae using mitochondrial genomic data. *Molecular phylogenetics and evolution* 49, 111-124.
- Lazarov, V. K., Fraering, P. C., Ye, W., Wolfe, M. S., Selkoe, D. J., Li, H. 2006. Electron microscopic structure of purified, active gamma-secretase reveals an aqueous intramembrane chamber and two pores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 6889-6894.
- Le Pennec, G., Perovic, S., Ammar, M. S., Grebenjuk, V. A., Steffen, R., Brummer, F., Müller, W. E. 2003. Cultivation of primmorphs from the marine sponge Suberites domuncula: morphogenetic potential of silicon and iron. *Journal of biotechnology* 100, 93-108.

- Lecointre, G., Le Guyader, H. (Eds.) 2001. Classification phylogénétique du vivant. *Belin*, Paris.
- Lévi, C. 1956. Etude des *Halisarca* de Roscoff. Embryologie et systématique des démosponges. *Archives de Zoologie expérimentale et générale* 93, 1-184.
- Lévi, C. (Ed. 1973. Systématique de la classe des Demospongiaria (Démosponges). *Masson & Compagnie*, Paris.
- Leys, S., Mackie, G. O. 1997. Electrical recording from a glass sponge. Nature 387, 29-30.
- Leys, S. P., Cronin, T. W., Degnan, B. M., Marshall, J. N. 2002. Spectral sensitivity in a sponge larva. *Journal of Comparative Physiology A. Neuroethology, Sensory, Neural and Behavioral Physiology* 188, 199-202.
- Leys, S. P., Degnan, B. M. 2001. Cytological basis of photoresponsive behavior in a sponge larva. *The Biological bulletin* 201, 323-338.
- Leys, S. P., Degnan, B. M. 2002. Embryogenesis and metamorphosis in a haplosclerid demosponge: gastrulation and transdifferentiation of larval ciliated cells to choanocytes. *Invertebrate Biology* 121, 171-189.
- Leys, S. P., Mackie, G. O., Meech, R. W. 1999. Impulse conduction in a sponge. *Journal of Experimental Biology* 202 (Pt 9), 1139-1150.
- Leys, S. P., Mackie, G. O., Reiswig, H. M. 2007. The biology of glass sponges. *Advances in Marine Biology* 52, 1-145.
- Leys, S. P., Meech, R. W. 2006. Physiology of coordination in sponges. Canadian Journal of Zoology 84, 288-306.
- Leys, S. P., Nichols, S. A., Adams, E. D. M. 2009. Epithelia and integration in sponges. *Integrative and comparative biology* 49, 167-177.
- Leys, S. P., Rohksar, D. S., Degnan, B. M. 2005. Sponges. Current Biology 15, R114-115.
- Lohmann, J. U., Endl, I., Bosch, T. C. 1999. Silencing of developmental genes in *Hydra*. *Developmental biology* 214, 211-214.
- Love, A. C. 2009. Marine invertebrates, model organisms, and the modern synthesis: epistemic values, evo-devo, and exclusion. *Theory in Biosciences* 128, 19-42.
- Lowe, C. J., Wu, M., Salic, A., Evans, L., Lander, E., Stange-Thomann, N., Gruber, C. E., Gerhart, J., Kirschner, M. 2003. Anteroposterior patterning in hemichordates and the origins of the chordate nervous system. *Cell* 113, 853-865.
- Mackie, G. O., Mills, C. E., Singla, C. L. 1992. Giant Axons and Escape Swimming in *Euplokamis dunlapae* (Ctenophora: Cydippida). *Biological Bulletin* 182, 248-256.
- Magie, C. R., Pang, K., Martindale, M. Q. 2005. Genomic inventory and expression of Sox and Fox genes in the cnidarian Nematostella vectensis. Development genes and evolution 215, 618-630.
- Maldonado. 2004. Choanoflagellates, choanocytes, and animal multicellularity. *Invertebrate Biology* 123, 1-22.
- Maldonado, M. 2006. The ecology of the sponge larva. *Canadian Journal of Zoology*, 175-194.
- Maldonado, M., Carmona, M. C., Uriz, M. J., Cruzado, A. 1999. Decline in Mesozoic reef-building sponges explained by silicon limitation. *Nature* 401, 785-788.
- Mallatt, J., Craig, C. W., Yoder, M. J. 2009. Nearly complete rRNA genes assembled from across the metazoan animals: Effects of more taxa, a structure-based alignment, and paired-sites evolutionary models on phylogeny reconstruction. *Molecular phylogenetics and evolution*.
- Manuel, M. 2007. Habilitation à diriger des recherches. L'apport de la phylogénie et des gènes de développement à l'anatomie comparée: quelques contributions portant particulièrement sur les animaux non bilateria (spongiaires, cnidaires, cténophores). *Université Pierre et Marie Curie, Paris 6*, Paris.

- Manuel, M., Borchiellini, C., Alivon, E., Le Parco, Y., Vacelet, J., Boury-Esnault, N. 2003a. Phylogeny and evolution of calcareous sponges: monophyly of calcinea and calcaronea, high level of morphological homoplasy, and the primitive nature of axial symmetry. *Systematic biology* 52, 311-333.
- Manuel, M., Borojevic, R., Boury-Esnault, N., Vacelet, J. (Eds.) 2002. Class Calcarea Bowerbank, 1864, Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges. *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, New York.
- Manuel, M., Boury-Esnault, N., Vacelet, J. 2003b. L'éponge ... une république cellulaire. *Pour la Science* 310.
- Manuel, M., Le Parco, Y. 2000. Homeobox gene diversification in the calcareous sponge, *Sycon raphanus. Molecular phylogenetics and evolution* 17, 97-107.
- Manuel, M., Le Parco, Y., Borchiellini, C. 2004. Comparative analysis of Brachyury Tdomains, with the characterization of two new sponge sequences, from a hexactinellid and a calcisponge. *Gene* 340, 291-301.
- Marletaz, F., Martin, E., Perez, Y., Papillon, D., Caubit, X., Lowe, C. J., Freeman, B., Fasano, L., Dossat, C., Wincker, P., Weissenbach, J., Le Parco, Y. 2006. Chaetognath phylogenomics: a protostome with deuterostome-like development. *Current Biology* 16, R577-578.
- Martindale, M. Q., Henry, J. Q. 1997. Reassessing embryogenesis in the Ctenophora: the inductive role of e1 micromeres in organizing ctene row formation in the 'mosaic' embryo, *Mnemiopsis leidyi*. *Development (Cambridge, England)* 124, 1999-2006.
- Martindale, M. Q., Henry, J. Q. 1999. Intracellular fate mapping in a basal metazoan, the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*, reveals the origins of mesoderm and the existence of indeterminate cell lineages. *Developmental biology* 214, 243-257.
- Martinelli, C., Spring, J. 2004. Expression pattern of the homeobox gene Not in the basal metazoan *Trichoplax adhaerens*. *Gene Expression Patterns* 4, 443-447.
- Medina, M., Collins, A. G., Silberman, J. D., Sogin, M. L. 2001. Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9707-9712.
- Medina, M., Collins, A. G., Taylor, J. W., Valentine, J. W., Lipps, J. H., Amaral-Zettler, L., Sogin, M. L. 2003. Phylogeny of Opisthokonta and the evolution of multicellularity and complexity in Fungi and Metazoa. *International Journal of Astrobiology* 2, 203-211.
- Micchelli, C. A., Esler, W. P., Kimberly, W. T., Jack, C., Berezovska, O., Kornilova, A., Hyman, B. T., Perrimon, N., Wolfe, M. S. 2003. Gamma-secretase/presenilin inhibitors for Alzheimer's disease phenocopy Notch mutations in *Drosophila*. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 17, 79-81.
- Mikhailov, K. V., Konstantinova, A. V., Nikitin, M. A., Troshin, P. V., Rusin, L. Y., Lyubetsky, V. A., Panchin, Y. V., Mylnikov, A. P., Moroz, L. L., Kumar, S., Aleoshin, V. V. 2009. The origin of Metazoa: a transition from temporal to spatial cell differentiation. *Bioessays* 31, 758-768.
- Miljkovic-Licina, M., Gauchat, D., Galliot, B. 2004. Neuronal evolution: analysis of regulatory genes in a first-evolved nervous system, the *hydra* nervous system. *Bio Systems* 76, 75-87.
- Miller, D. J., Ball, E. E. 2000. The coral *Acropora*: what it can contribute to our knowledge of metazoan evolution and the evolution of developmental processes. *Bioessays* 22, 291-296.
- Miller, D. J., Ball, E. E. 2005. Animal evolution: the enigmatic phylum placozoa revisited. *Current Biology* 15, R26-28.

- Miller, D. J., Ball, E. E. 2008. Animal evolution: *Trichoplax*, trees, and taxonomic turmoil. *Current Biology* 18, R1003-1005.
- Miller, D. J., Hayward, D. C., Reece-Hoyes, J. S., Scholten, I., Catmull, J., Gehring, W. J., Callaerts, P., Larsen, J. E., Ball, E. E. 2000. Pax gene diversity in the basal cnidarian Acropora millepora (Cnidaria, Anthozoa): implications for the evolution of the Pax gene family. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 4475-4480.
- Miller, G. 2009. On the origin of the nervous system. Science (New York, N.Y. AAAS, pp. 24-26).
- Miyata, T., Suga, H. 2001. Divergence pattern of animal gene families and relationship with the Cambrian explosion. *Bioessays* 23, 1018-1027.
- Momose, T., Houliston, E. 2007. Two oppositely localised frizzled RNAs as axis determinants in a cnidarian embryo. *PLoS biology* 5, e70.
- Monteiro, A. S., Schierwater, B., Dellaporta, S. L., Holland, P. W. 2006. A low diversity of ANTP class homeobox genes in Placozoa. *Evolution & development* 8, 174-182.
- Morohashi, Y., Kan, T., Tominari, Y., Fuwa, H., Okamura, Y., Watanabe, N., Sato, C., Natsugari, H., Fukuyama, T., Iwatsubo, T., Tomita, T. 2006. C-terminal fragment of presenilin is the molecular target of a dipeptidic gamma-secretase-specific inhibitor DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester). The Journal of biological chemistry 281, 14670-14676.
- Mukhina, Y. I., Kumeiko, V. V., Podgornaya, O. I., Efremova, S. M. 2006. The fate of larval flagellated cells during metamorphosis of the sponge *Halisarca dujardini*. *The International journal of developmental biology* 50, 533-541.
- Müller, W. E. 2001. Review: How was metazoan threshold crossed? The hypothetical Urmetazoa. *Comparative biochemistry and physiology* 129, 433-460.
- Muller, W. E., Muller, I. M. 2003. Analysis of the sponge [Porifera] gene repertoire: implications for the evolution of the metazoan body plan. *Prog Mol Subcell Biol* 37, 1-33.
- Müller, W. E., Schroder, H. C., Skorokhod, A., Bunz, C., Muller, I. M., Grebenjuk, V. A. 2001. Contribution of sponge genes to unravel the genome of the hypothetical ancestor of Metazoa (Urmetazoa). *Gene* 276, 161-173.
- Muricy, G., Boury-Esnault, N., Bézac, C., Vacelet, J. 1998. Taxonomic revision of the Mediterranean *Plakina* Schulze (Porifera, Demospongiae, Homoscleromorpha). *Zoological Journal of the Linnean Society* 124, 169-203.
- Muricy, G., Diaz, M. C. (Eds.) 2002. Order Homosclerophorida Dendy, 1905, Family Plakinidae Schulze, 1880. *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, New-York.
- Muricy, G., Solé Cava, A. M., Thorpe, J. P., Boury-Esnault, N. 1996. Genetic evidence for extensive cryptic speciation in the subtidal sponge *Plakina trilopha* (Porifera: Demospongiae: Homoscleromorpha) from the Western Mediterranea. *Marine Ecology Progress Series* 138, 181-187.
- Nam, J., Nei, M. 2005. Evolutionary change of the numbers of homeobox genes in bilateral animals. *Molecular biology and evolution* 22, 2386-2394.
- Nichols, S. A. 2005. An evaluation of support for order-level monophyly and interrelationships within the class Demospongiae using partial data from the large subunit rDNA and cytochrome oxidase subunit I. *Molecular phylogenetics and evolution* 34, 81-96.
- Nichols, S. A., Dirks, W., Pearse, J. S., King, N. 2006. Early evolution of animal cell signaling and adhesion genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 12451-12456.

- Nickel, M. 2004. Kinetics and rhythm of body contractions in the sponge *Tethya wilhelma* (Porifera: Demospongiae). *Journal of Experimental Biology* 207, 4515-4524.
- Nickel, M. 2006. Like a 'rolling stone': quantitative analysis of the body movement and skeletal dynamics of the sponge *Tethya wilhelma*. *Journal of Experimental Biology* 209, 2839-2846.
- Nickel, M., Schiller, F. 2010. The evolutionary emergence of synaptic nervous systems -What can we learn from the non-synaptic, nerve-less Porifera ? *Invertebrate Biology* Sous presse.
- Nielsen, C. 2008. Six major steps in animal evolution: are we derived sponge larvae? *Evolution & development* 10, 241-257.
- Nielsen, K., Scharff, N., Eibye-Jacobsen, D. 1996. Cladistic analyses of the animal kingdom. Biological Journal of the Linnean Society 57, 385-410.
- Nylander, J. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Pang, K., Martindale, M. Q. 2008a. Ctenophores. Current Biology 18, R1119-1120.
- Pang, K., Martindale, M. Q. 2008b. Developmental expression of homeobox genes in the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*. *Development genes and evolution* 218, 307-319.
- Perovic, S., Schroder, H. C., Sudek, S., Grebenjuk, V. A., Batel, R., Stifanic, M., Müller, I. M., Müller, W. E. 2003. Expression of one sponge *Iroquois* homeobox gene in primmorphs from *Suberites domuncula* during canal formation. *Evolution & development* 5, 240-250.
- Peterson, K. J., Butterfield, N. J. 2005. Origin of the Eumetazoa: testing ecological predictions of molecular clocks against the Proterozoic fossil record. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 9547-9552.
- Peterson, K. J., Cotton, J. A., Gehling, J. G., Pisani, D. 2008. The Ediacaran emergence of bilaterians: congruence between the genetic and the geological fossil records. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 363, 1435-1443.
- Peterson, K. J., Eernisse, D. J. 2001. Animal phylogeny and the ancestry of bilaterians: inferences from morphology and 18S rDNA gene sequences. *Evolution & development* 3, 170-205.
- Peterson, K. J., Sperling, E. A. 2007. Poriferan ANTP genes: primitively simple or secondarily reduced? *Evolution & development* 9, 405–408.
- Philippe, H., Brinkmann, H., Martinez, P., Riutort, M., Baguna, J. 2007. Acoel flatworms are not platyhelminthes: evidence from phylogenomics. *PLoS ONE* 2, e717.
- Philippe, H., Derelle, R., Lopez, P., Pick, K., Borchiellini, C., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Renard, E., Houliston, E., Queinnec, E., Da Silva, C., Wincker, P., Le Guyader, H., Leys, S., Jackson, D. J., Schreiber, F., Erpenbeck, D., Morgenstern, B., Worheide, G., Manuel, M. 2009. Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships. *Current Biology* 19, 706-712.
- Philippe, H., Lartillot, N., Brinkmann, H. 2005. Multigene analyses of bilaterian animals corroborate the monophyly of Ecdysozoa, Lophotrochozoa, and Protostomia. *Molecular biology and evolution* 22, 1246-1253.
- Philippe, H., Telford, M. J. 2006. Large-scale sequencing and the new animal phylogeny. *Trends in ecology & evolution (Personal edition)* 21, 614-620.
- Pires-daSilva, A., Sommer, R. J. 2003. The evolution of signalling pathways in animal development. *Nature reviews* 4, 39-49.
- Pollard, S. L., Holland, P. W. 2000. Evidence for 14 homeobox gene clusters in human genome ancestry. *Current Biology* 10, 1059-1062.
- Posada, D., Crandall, K. A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics (Oxford, England)* 14, 817-818.

- **Poulson, D. F.** 1937. Chromosomal deficiencies and embryonic development of *Drosophila* melanogaster. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 23, 133-137.
- Poulson, D. F. 1940. The effects of certain X-chromosome deficiences in the embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Zoology* 83, 271-325.
- Purves, Augustine, Fitzpatrick, Hall, Lamantia, McNamara, Williams (Eds.) 2004. Neurosciences. *de Boeck*, Bruxelles.
- Putnam, N. H., Srivastava, M., Hellsten, U., Dirks, B., Chapman, J., Salamov, 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 (New York, N.Y* 317, 86-94.
- Ramoino, P., Gallus, L., Paluzzi, S., Raiteri, L., Diaspro, A., Fato, M., Bonanno, G., Tagliafierro, G., Ferretti, C., Manconi, R. 2007. The GABAergic-like system in the marine demosponge Chondrilla nucula. *Microscopy Research and Techique* 70, 944-951.
- Reid, R. E. H. (Ed. 1970. Tetraxons and demosponge phylogeny. Academic Press, London.
- Renard, E., Vacelet, J., Gazave, E., Lapébie, P., Borchiellini, C., Ereskovsky, A. V. 2009. Origin of the neuro-sensory system: new and expected insights from sponges. *Integrative Zoology*, 294-308.
- Rentzsch, F., Anton, R., Saina, M., Hammerschmidt, M., Holstein, T. W., 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. *Developmental biology* 296, 375-387.
- Rentzsch, F., Fritzenwanker, J. H., Scholz, C. B., Technau, U. 2008. FGF signalling controls formation of the apical sensory organ in the cnidarian Nematostella vectensis. *Development (Cambridge, England)* 135, 1761-1769.
- Richards, G. S., Degnan, B. M. 2009. The dawn of developmental signaling in the metazoa. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* In press.
- Richards, G. S., Simionato, E., Perron, M., Adamska, M., Vervoort, M., Degnan, B. M. 2008. Sponge genes provide new insight into the evolutionary origin of the neurogenic circuit. *Current Biology*.
- Richelle-Maurer, E., Boury-Esnault, N., Itskovich, V. B., Manuel, M., Pomponi, S. A., Van de Vyver, G., Borchiellini, C. 2006. Conservation and phylogeny of a novel family of non-Hox genes of the Antp class in Demospongiae (porifera). *Journal of molecular evolution* 63, 222-230.
- **Richelle-Maurer, E., Van de Vyver, G.** 1999. Temporal and spatial expression of EmH-3, a homeobox-containing gene isolated from the freshwater sponge Ephydatia muelleri. *Mechanisms of ageing and development* 109, 203-219.
- Richelle-Maurer, E., Van de Vyver, G., Vissers, S., Coutinho, C. C. 1998. Homeoboxcontaining genes in freshwater sponges: characterization, expression, and phylogeny. *Progress in Molecular and Subcellular Biology* 19, 157-175.
- Rokas, A. 2008a. The molecular origins of multicellular transitions. *Current Opinion in Genetics and Development* 18, 472-478.
- **Rokas, A.** 2008b. The origins of multicellularity and the early history of the genetic toolkit for animal development. *Annual review of genetics* 42, 235-251.
- Ruiz-Trillo, I., Roger, A. J., Burger, G., Gray, M. W., Lang, B. F. 2008. A phylogenomic investigation into the origin of metazoa. *Molecular biology and evolution* 25, 664-672.

- Ryan, J. F., Burton, P. M., Mazza, M. E., Kwong, G. K., Mullikin, J. C., Finnerty, J. R. 2006. The cnidarian-bilaterian ancestor possessed at least 56 homeoboxes: evidence from the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis*. *Genome biology* 7, R64.
- Ryan, J. F., Mazza, M. E., Pang, K., Matus, D. Q., Baxevanis, A. D., Martindale, M. Q., Finnerty, J. R. 2007. Pre-bilaterian origins of the Hox cluster and the Hox code: evidence from the sea anemone, *Nematostella vectensis*. *PLoS ONE* 2, e153.
- Ryan, T. J., Grant, S. G. 2009. The origin and evolution of synapses. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 701-712.
- Sakarya, O., Armstrong, K. A., Adamska, M., Adamski, M., Wang, I. F., Tidor, B., Degnan, B. M., Oakley, T. H., Kosik, K. S. 2007. A post-synaptic scaffold at the origin of the animal kingdom. *PLoS ONE* 2, e506.
- Sakarya, O., Conaco, C., Egecioglu, O., Solla, S. A., Oakley, T. H., Kosik, K. S. 2009. Evolutionary Expansion and Specialization of the PDZ Domains. *Molecular biology and evolution*.
- Schierwater, B. 2005. My favorite animal, Trichoplax adhaerens. Bioessays 27, 1294-1302.
- Schierwater, B., de Jong, D., Desalle, R. 2009a. Placozoa and the evolution of Metazoa and intrasomatic cell differentiation. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41, 370-379.
- Schierwater, B., Eitel, M., Jakob, W., Osigus, H. J., Hadrys, H., Dellaporta, S. L., Kolokotronis, S. O., Desalle, R. 2009b. Concatenated analysis sheds light on early metazoan evolution and fuels a modern "urmetazoan" hypothesis. *PLoS biology* 7, e20.
- Schierwater, B., Kamm, K., Srivastava, M., Rokhsar, D., Rosengarten, R. D., Dellaporta,
   S. L. 2008. The early ANTP gene repertoire: insights from the placozoan genome.
   *PLoS ONE* 3, e2457.
- Schierwater, B., Kuhn, K. 1998. Homology of Hox genes and the zootype concept in early metazoan evolution. *Molecular phylogenetics and evolution* 9, 375-381.
- Schubert, E., Laudet. 2004. La pensée à fleur de peau. Medecine/Science (Paris).
- Schwarz, J. A., Brokstein, P. B., Voolstra, C., Terry, A. Y., Manohar, C. F., Miller, D. J., Szmant, A. M., Coffroth, M. A., Medina, M. 2008. Coral life history and symbiosis: functional genomic resources for two reef building Caribbean corals, *Acropora palmata* and *Montastraea faveolata*. *BMC genomics* 9, 97.
- Segawa, Y., Suga, H., Iwabe, N., Oneyama, C., Akagi, T., Miyata, T., Okada, M. 2006. Functional development of Src tyrosine kinases during evolution from a unicellular ancestor to multicellular animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 12021-12026.
- Seimiya, M., Ishiguro, H., Miura, K., Watanabe, Y., Kurosawa, Y. 1994. Homeoboxcontaining genes in the most primitive metazoa, the sponges. *European Journal of Biochemistry* 221, 219-225.
- Seimiya, M., Naito, M., Watanabe, Y., Kurosawa, Y. 1998. Homeobox genes in the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis*. *Progress in Molecular and Subcellular Biology* 19, 133-155.
- Seimiya, M., Watanabe, Y., Kurosawa, Y. 1997. Identification of POU-class homeobox genes in a freshwater sponge and the specific expression of these genes during differentiation. *European Journal of Biochemistry* 243, 27-31.
- Selosse, M. A., Godelle, B. 2007. L'évolution mène toujours au progrès. La recherche.
- Shalchian-Tabrizi, K., Minge, M. A., Espelund, M., Orr, R., Ruden, T., Jakobsen, K. S., Cavalier-Smith, T. 2008. Multigene phylogeny of choanozoa and the origin of animals. *PLoS ONE* 3, e2098.

- Shilo, B. Z. 2009. Phyllopod at the intersection of developmental signalling pathways. *The EMBO journal* 28, 311-312.
- Signorovitch, A. Y., Buss, L. W., Dellaporta, S. L. 2007. Comparative genomics of large mitochondria in placozoans. *PLoS Genetics* 3, e13.
- Signorovitch, A. Y., Dellaporta, S. L., Buss, L. W. 2005. Molecular signatures for sex in the Placozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15518-15522.
- Simionato, E. 2008. Thèse de doctorat. Evolution et diversification des protéines à basic Helix-Loop-Helix chez les métazoaires : apports pour la compréhension de l'évolution du système nerveux et de la neurogenèse. Gènes, Génomes, Cellules. *Paris-Sud XI*, Paris.
- Simionato, E., Ledent, V., Richards, G., Thomas-Chollier, M., Kerner, P., Coornaert, D., Degnan, B. M., Vervoort, M. 2007. Origin and diversification of the basic helixloop-helix gene family in metazoans: insights from comparative genomics. *BMC evolutionary biology* 7, 33.
- Simpson, T. L. (Ed. 1984. The Cell Biology of Sponges. Springer, New-York.
- Solé Cava, A. M., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Thorpe, J. P. 1992. Biochemical genetic divergence and systematics in sponges of the genera *Corticium* and *Oscarella* (Demospongiae: Homoscleromorpha) in the Mediterranean Sea. *Marine Biology* 113, 299-304.
- Sperling, E. A., Peterson, K. J., Pisani, D. 2009. Phylogenetic-signal dissection of nuclear housekeeping genes supports the paraphyly of sponges and the monophyly of Eumetazoa. *Molecular biology and evolution* 26, 2261-2274.
- Sperling, E. A., Pisani, D., Peterson, K. J. (Eds.) 2007. Poriferan Paraphyly and its Implications for Precambrian Paleobiology. *Geological Society*, London.
- 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.
- Srivastava, M., Larroux, C., Lu, D. R., Mohanty, K., Chapman, J., Degnan, B., Rokhsar, D. S. in press. Early evolution of the LIM homeobox gene family. *BMC Biology* 8, 4.
- Steele, R. E. 2002. Developmental signaling in *Hydra*: what does it take to build a "simple" animal? *Developmental biology* 248, 199-219.
- Steele, R. E. 2005. Genomics of Basal Metazoans. *Integrative and comparative biology* 45, 639-648.
- Swofford, D. L. (Ed. 2000. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods), Sunderland, Massachusetts.
- Syed, T., Schierwater, B. 2002. *Trichoplax adhaerens*: Discoverd as a missing link, forgottent as a hydrozoan, re-discovered as a key to metazoan evolution. *Vie Milieu*, 177-187.
- Tamm, C., Duckworth, J. K., Hermanson, O., Ceccatelli, S. 2008. Methylmercury inhibits differentiation of rat neural stem cells via Notch signalling. *Neuroreport* 19, 339-343.
- Technau, U., Rudd, S., Maxwell, P., Gordon, P. M., Saina, M., Grasso, L. C., Hayward,
   D. C., Sensen, C. W., Saint, R., Holstein, T. W., Ball, E. E., Miller, D. J. 2005.
   Maintenance of ancestral complexity and non-metazoan genes in two basal cnidarians.
   *Trends in Genetics* 21, 633-639.
- Telford, M. J. 2006. Animal phylogeny. Current Biology 16, R981-985.
- Telford, M. J. 2007. A single origin of the central nervous system? Cell 129, 237-239.

- Tompkins-Macdonald, G. J., Gallin, W. J., Sakarya, O., Degnan, B., Leys, S. P., Boland, L. M. 2009. Expression of a poriferan potassium channel: insights into the evolution of ion channels in metazoans. *Journal of Experimental Biology* 212, 761-767.
- True, J. R., Carroll, S. B. 2002. Gene co-option in physiological and morphological evolution. *Annual review of cell and developmental biology* 18, 53-80.
- Vacelet, J. 2008. A new genus of carnivorous sponges (Porifera: Poecilosclerida, Cladorhizidae) from the deep N-E Pacific, and remarks on the genus *Neocladia*. *Zootaxa*, 57-65.
- Van Soest, R. W. M. 1984. Deficient *Merlia normani Kirkpatrick*, 1908, from the Curacao reefs, with a discussion on the phylogenetic interpretation of sclerosponges. . *Bijdragen tot de Dierkunde* 54, 211-219.
- Van Soest, R. W. M., Boury-Esnault, N., Hooper, J. N. A., Rützler, K., de Voogd, N. J., Alvarez, B., Hajdu, E., Pisera, A. B., Vacelet, J., Manconi, R., Schoenberg, C., Janussen, D., Tabachnick, K. R., Klautau, M. 2008. World Porifera database <u>http://www.marinespecies.org/porifera</u>.
- Voigt, O., Collins, A. G., Pearse, V. B., Pearse, J. S., Ender, A., Hadrys, H., Schierwater, B. 2004. Placozoa -- no longer a phylum of one. *Current Biology* 14, R944-945.
- Wang, X., Lavrov, D. V. 2007. Mitochondrial genome of the homoscleromorph Oscarella carmela (Porifera, Demospongiae) reveals unexpected complexity in the common ancestor of sponges and other animals. *Molecular biology and evolution* 24, 363-373.
- Wang, X., Lavrov, D. V. 2008. Seventeen new complete mtDNA sequences reveal extensive mitochondrial genome evolution within the Demospongiae. *PLoS ONE* 3, e2723.
- Watanabe, H., Fujisawa, T., Holstein, T. W. 2009. Cnidarians and the evolutionary origin of the nervous system. *Development, growth & differentiation* 51, 167-183.
- Westfall, J. A., Elliott, C. F., Carlin, R. W. 2002. Ultrastructural evidence for two-cell and three-cell neural pathways in the tentacle epidermis of the sea anemone *Aiptasia pallida*. *Journal of Morphology* 251, 83-92.
- Weyrer, S., Rützler, K., Rieger, R. 1999. Serotonin in Porifera ? Evidence from the developing *Tedania ignis*, the caribbean fire sponge (Demospongiae). *Memoirs of the Queensland Museum* 06, 659-665.
- Wheeler, B. M., Heimberg, A. M., Moy, V. N., Sperling, E. A., Holstein, T. W., Heber, S., Peterson, K. J. 2009. The deep evolution of metazoan microRNAs. *Evolution & development* 11, 50-68.
- Wiedenmayer, F. 1994. Contributions to the knowledge of post-palaeozoic neretic and archibenthal sponges (Porifera): The stratigraphic record, ecology, and global distribution of intermediate and higher taxa. *Schweizerische Paläontologische Abhandlungen* 116, 1-147.
- Wiens, M., Mangoni, A., D'Esposito, M., Fattorusso, E., Korchagina, N., Schroder, H. C., Grebenjuk, V. A., Krasko, A., Batel, R., Müller, I. M., Müller, W. E. 2003. The molecular basis for the evolution of the metazoan bodyplan: extracellular matrixmediated morphogenesis in marine demosponges. *Journal of molecular evolution* 57 Suppl 1, S60-75.
- Wittlieb, J., Khalturin, K., Lohmann, J. U., Anton-Erxleben, F., Bosch, T. C. 2006. Transgenic *Hydra* allow in vivo tracking of individual stem cells during morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 6208-6211.
- Woollacott, R., Hadfield, M. G. 1996. Induction of metamorphosis in larvae of a sponge. *Invertebrate Biology* 115, 257-262.
- Yamada, A., Martindale, M. Q. 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. *Development genes and evolution* 212, 338-348.

- Yamada, A., Martindale, M. Q., Fukui, A., Tochinai, S. 2009. Highly conserved functions of the Brachyury gene on morphogenetic movements: insight from the early-diverging phylum Ctenophora. *Developmental biology* in press.
- Yamada, A., Pang, K., Martindale, M. Q., Tochinai, S. 2007. Surprisingly complex T-box gene complement in diploblastic metazoans. *Evolution & development* 9, 220-230.
- Zrzavy, J., Mihulkau, S., Kepka, P., Bezdek, A., Tietz, D. 1998. Phylogeny of the Metazoa based on morphological and 18S ribosomal DNA evidence *Cladistics* 14, 249-285.

### ANNEXE I

# Article 7: Polyphyly of the genus *Axinella* and of the family Axinellidae (Porifera: *Demospongiae*)

Ce travail dont je suis co-1<sup>e</sup> auteur a fait l'objet d'un article de recherche actuellement en cours de révision pour la revue Molecular Phylogenetics and Evolution

#### Polyphyly of the genus Axinella and of the family Axinellidae

#### (Porifera: Demospongiae)

Gazave Eve<sup>\*1</sup>, Carteron Sophie<sup>\*1</sup>, Richelle-Maurer Evelyn<sup>2</sup>, Boury-Esnault Nicole<sup>1</sup>, Borchiellini Carole<sup>1§</sup>

 <sup>1</sup> Université Aix-Marseille 2, UMR-CNRS 6540 DIMAR, Station marine d'Endoume, Rue de La Batterie des Lions, 13007-Marseille France.
 <sup>2</sup> Université Libre de Bruxelles, Laboratoire de Physiologie moléculaire de la Cellule, CP 300, 50 av. F. Roosevelt, 1050 Brussels, Belgium

<sup>§</sup> Corresponding author: Carole Borchiellini, Université Aix-Marseille 2, UMR-CNRS 6540 DIMAR, Station marine d'Endoume, Rue de La Batterie des Lions, 13007-Marseille France. E-mail address: <u>carole.borchiellini@univmed.fr</u>

\* both authors contributed equally to this work

#### **KEY WORDS**

Axinella, Acanthella, Cymbastella, Demospongiae, molecular phylogeny, PhyloCode

#### ABSTRACT

The genus *Axinella* is difficult to define on the basis of morphological characters and includes in consequence a heterogeneous assemblage of species. Several previous authors have suspected the polyphyly of this genus as well as the polyphyly of the family. In order to clarify the phylogeny of Axinellidae and *Axinella*, we propose a new hypothesis based on two independent molecular markers (18S and 28S rDNA).

The nine species of *Axinella* of our dataset belong to three clades which are supported by V7 secondary structures of the 18SrDNA. One contains the type species of the genus: *A. polypoides*, this is the only clade that can be named *Axinella*. A new clade *Cymbaxinella* is named, following the *PhyloCode*, with *C. damicornis* as type species of this clade. *Axinella cannabina* is not an *Axinella* and is reallocated to *Acanthella*. The clades *Agelas* and *Cymbaxinella* constitute a monoplyletic group that we have named *Agelasida*.

#### INTRODUCTION

The phylogeny of *DemospongiaeP* has been revisited recently and congruent results have been obtained with ribosomal DNA (Borchiellini et al., 2004), mitochondrial DNA (Lavrov et al., 2008) and nuclear housekeeping genes (Sperling et al., 2009). Four clades G1 (*KeratosaP*), G2 (*MyxospongiaeP*), G3 (marine Haplosclerida) and G4 (Spongillina, *TetractinellidaP*, Poecilosclerida, Agelasida, Halichondrida, Hadromerida) have been defined (Borchiellini et al., 2004). *TetractinellidaP* is a well supported sub-clade (see Erpenbeck and Wörheide, 2007 for references), but the other orders included in G4 are not recovered. The phylogenetic relationships within G4 have not been elucidated (Erpenbeck and Wörheide, 2007).

A good example of this difficulty of resolution is Axinella Schmidt, 1862, genus type of the family Axinellidae Carter, 1875 which appears to be polyphyletic according to many recent molecular phylogenies (Solé-Cava and Boury-Esnault, 1999; Alvarez et al., 2000; Redmond and McCormack, 2008; Lavrov et al., 2008; Borchiellini et al., 2004; Nichols, 2005; Erpenbeck et al., 2004, 2005, 2007; Erpenbeck and Wörheide, 2007). The genus Axinella Schmidt, 1862 currently includes a heterogeneous assemblage of species although a recent definition of Axinella is given in Systema Porifera (Alvarez & Hooper, 2002 p. 724): "Axinellidae with choanosomal skeleton differentiated in axial (condensed or vaguely reticulated) and extra axial (plumoreticulated) region. Megascleres are styles or oxeas. Microscleres if present are microraphids and trichodragmata". The definition of this genus is not based on any synapomorphy; many species included in Axinella lack some features which are generally recognised as typical of the genus. In addition, some of the characters can be variable at the intra-specific level. This problem of giving a satisfactory diagnosis of this genus sheds doubt on the real phylogenetic status of this group, as well as of the Axinellidae. Thus, the definition of this family and its members have been emended regularly from Ridley and Dendy (1887) to Alvarez and Hooper (2002) in function of the data taken into account to reconstitute the phylogenetic history of the group.

This subjective character choice led in the last fifty years to two main opinions. Lévi (1973) has erected an order Axinellida for the family Axinellidae and other close families such as Bubaridae, Desmoxyidae, Hemiasterellidae, Trachycladidae, Raspailiidae, Euryponidae, Rhabderemiidae, Sigmaxinellidae (see Table 1) based on the characters of the skeleton and the type of reproduction (oviparity). Alvarez and Hooper (2002) following Soest et al. (1990)

abandoned the order Axinellida and reattributed the families to Poecilosclerida (Raspailiidae, Euryponidae, Sigmaxinellidae, Rhabderemiidae), Hadromerida (Hemiasterellidae, Trachycladidae) and included the Axinellidae (with Bubaridae and Desmoxyidae) among the Halichondrida. The data taken into account in this classification were mainly based on the type of megascleres and microscleres present in the different genera and families. The recent molecular phylogenies have never recovered the monophyly of an order Halichondrida with so few morphological characters (Erpenbeck, 2004; Erpenbeck and Wörheide, 2007). In order to clarify the phylogeny of Axinellidae and *Axinella*, a new hypothesis based on two

independent molecular markers (18S and 28S rRNA) and predicted secondary structures considered as possible valid molecular synapomorphies is proposed. An appropriate sample of *Axinella* (9 species) and three other genera of the family Axinellidae and close families Dictyonellidae (3 genera), Desmoxyidae (1 genus), Agelasidae (5 species), Halichondriidae (1 genus), Suberitidae (2 genus) and 3 outgroups belonging to *TetractinellidaP*, was used to address this issue (Table 2).

#### **MATERIAL AND METHODS**

#### Sampling and sequence acquisition

The species analysed in this study and their collecting sites are listed in Table 2 (new sequences are indicated in bold characters). Procedures used for genomic DNA extraction, cloning and DNA sequencing are described in Borchiellini et al. (2001). For partial 28S rDNA amplification (400-450 bp) and for total 18S rDNA amplification, the primers used are the same as those described in Borchiellini et al. (2001). For 28s rDNA, another set of primers was designed to obtain a longer fragment (1100-1200 pb) containing domains C1 to D3: Forward (S1) ACC CGC TGA ATT TAA GCA T, Reverse (Y) AGT CTT TCG CCC CTA TAC CCA. The total 18S and partial 28S rDNA gene sequences resulting from this work have been deposited in the GenBank database. Their respective accession numbers are listed in Table 2. Others sequences used for this work came from GenBank (Table 2).

#### Sequence alignment and phylogenetic analysis

Initial sequence alignment was performed using ClustalX (Thompson et al., 1997) and subsequently corrected by eye on Bioedit Sequence Alignment Editor 5.09 (Hall 1999). The

final 28S alignment contains 33 species, 1148 positions, of which 507 are constant and 549 parsimony informative. The final 18S alignment contains 33 species, 1814 characters, of which 1482 are constant, 98 are parsimony uninformative and 234 parsimony informative. A combined dataset was created by adding 18S and 28S rDNA sequences for the same set of organisms whenever possible (29 species). This combined dataset contains 2953 positions, 1998 of which are constant and 728 parsimony informative. The alignments are available from the corresponding author upon request.

Phylogenetic analyses were performed using parsimony, distance, maximum likelihood and Bayesian methods. We used PAUP 4.0 (Swofford, 2000) for parsimony and distance phylogenetic analyses. Distance analyses were performed using neighbour-joining (NJ) with distances corrected by Kimura's two-parameter model. For maximum parsimony (MP) analyses, characters were always treated as unordered and unweighted. MP trees were computed using heuristic searches with 500 replicates of random taxon addition sequence and TBR branch swapping. For maximum likelihood (ML) analysis we used the phyml software (Guindon and Gascuel, 2003), with the model GTR. Parameters were estimated from the result of an MP heuristic search. Between site variation was estimated using a discrete approximation of the gamma distribution with 4 rate categories. Gaps were treated as missing data. The statistical robustness of the tree topology was assessed by bootstrap resampling (500 replicates for NJ and MP, 500 replicates for ML). Bayesian analysis was performed with MrBayes 3.1 with the nucleic acid model GTR. Two sets of four independent simultaneous Metropolis-couples Markov chains Monte Carlo were run for 5 million generations and sampled every hundredth generation. The runs were monitored for convergence and an adequate burn-in was removed (above 25% of tree and parameters). Bayesian posterior probabilities (PP) were used for assessing the confidence value of each node. There were no gaps in the sequences, but some sequences were incomplete; lacking positions were scored as missing data.

Given that bootstrap proportion values (BP values) are a conservative measure of a clade support (Hillis and Bulls, 1993) and Bayesian posterior probabilities (PP values) might be overestimations (Huelsenbeck and Rannala, 2004), PP values >95% and BP values >75% were interpreted as giving strong support to the respective clades.

#### Secondary structure analysis of 18S sequences

MFold server (Zuker, 2003; <u>http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/MobylePortal/portal.py?form=mfold</u>) was employed to defined secondary structures of

V4 and V7 variable regions of the gene. These regions were defined as covering respectively helices 23/24 and helice 43 (Wuyts et al., 2002; Redmond and McCormack, 2008). The default setting for all parameters were used except for the temperature (20°C: average ambient temperature for the species studied). As a majority, when multiple secondary structures were found, the structure with the lowest free energy (dG in Kcal/mol) was chosen, but for *Axinella polypoides* V4 secondary structure, the best compatible prediction was chosen.

#### Phylogenetic nomenclature

Following previous authors (Manuel et al., 2003; Borchiellini et al., 2004; Cárdenas et al., 2009), we have implemented phylogenetic definitions following the principles and rules of the *PhyloCode v.4b (http://www.ohiou.edu/PhyloCode/)*. Only well supported clades were named following Article 9.4. All clade names will be written in italics (*PhyloCode* Recommendation 6.1A). When possible, pre-existing names were used to avoid the proliferation of names (conversion in the sense of the *PhyloCode* recommendation, 10.1). Names are employed in a sense close to their classical sense in the Linnean system (recommendation 10A). Branch-based definitions are employed when the resolution is better outside the clade than within, and node-based definitions are used when the resolution is better within than outside the clade. Specifiers are species names.

#### RESULTS

To investigate the phylogenetic status of the genus *Axinella*, we analysed three datasets consisting of 1148 nucleotides for 28S, 1814 nucleotides for 18S, 2953 nucleotides for combined dataset using parsimony, distance, maximum likelihood and Bayesian methods (see Methods). The resulting phylogenies are displayed in Fig. 1A-C.

#### Analyses of the 18S rDNA sequence dataset

A first analysis of 18S rDNA sequences from 33 species belonging to Agelasida, Halichondrida and Hadromerida orders were performed (Table 2). Four trees were reconstructed (under MP, NJ, ML, BI) that differed only between taxa in the unresolved parts of the topologies and the ML topology is presented in Fig.1A. In this tree, whatever the

phylogenetic reconstruction methods used, the genus *Axinella* is split up into three distinct clades named Axi 1, Axi 2 and Axi 3 and thus appears polyphyletic.

A first clade (Axi 1) including the type species of the genus *Axinella polypoides, A. vaceleti, A. infundibuliformis* and *Dragmadicon reticulatum* is supported by 83%, 97%, 99.4% bootstrap values (MP, NJ, ML) and pp=1 in Bayesian. A second clade (Axi 2) includes *Axinella cannabina* and three species of Dictyonellidae: *Dictyonella incisa, D. pelligera* and *Acanthella acuta.* This clade is highly supported by bootstrap values of respectively 100%, 99%, 99.2% in MP, NJ, ML and pp=1 in Bayesian. The third clade (Axi 3) clusters *Axinella damicornis, Ptilocaulis fusiformis, A. corrugata, A. verrucosa* and *Cymbastela cantharella* and is supported by 88%, 77%, 87.6% bootstrap values (MP, NJ, ML) and pp=1 in Bayesian. *A. damicornis* and *P. fusiformis* show a close relationship with bootstrap values of 100 % (MP, NJ, ML) and pp=1 in Bayesian.

This topology also suggests the polyphyly of the Axinellidae family according to the strong grouping of *Axinella cannabina* with several Dictyonellidae species (Axi 2) and the clustering between two *Ptilocaulis* species and *Myrmekioderma sp.* (100% (MP, NJ, ML), pp=1 in Bayesian, the only representative of the Desmoxyidae family.

All these analyses favour a close relationship between the clade Axi 3 and the clade containing the *Agelas* species included in these analyses as well as a grouping between *Spongosorites genitrix* and several Hadromerida species rendering the Halichondrida order polyphyletic.

These analyses, including species belonging to three different orders and six families, reveal also other features: the Dictyonellidae family emerges with poor support in paraphyly, with a first clade represented here by two *Dictyonella* species and one *Acanthella* (named Axi 2), followed by a clade including five *Scopalina* species. The latter appears as the sister group of ((Suberitidae+Spongosorites genitrix) + (Axi 3 + Agelasidae)). Finally, the genus *Ptilocaulis* is divided into two clades. The type-species of the genus *P. walpersi* and *P. spiculifer* form a well-supported clade with *Myrmekioderma* sp with 100 % of bootstrap respectively in MP, NJ, ML and pp=1 in Bayesian, whereas *Ptilocaulis spiculifer* is included in Axi 3.

#### 28S rDNA dataset

To complete and corroborate the results obtained with the 18S rDNA, an analysis of 28S rDNA partial sequences was performed. As for the 18S, four trees were reconstructed, the tree presented (rooted on *TetractinellidaP*) results from MP analysis (Fig.1B). Results of analyses of 28S rDNA dataset are in general agreement with the results obtained with 18S rDNA. The

molecular tree obtained suggests polyphyly of the genus *Axinella* as well as polyphyly of the Axinellidae family and the Halichondrida order.

*Axinella* species are grouped in three distinct clades labelled with the same codes Axi 1, Axi 2 and Axi 3 with high confidence values for each node whatever the method employed. In addition to these three clades, we recovered the other main clades obtained in 18S analyses: a clade comprising Agelasidae species, a clade clustering three Suberitidae species with *Spongosorites genetrix*, a *Scopalina* group and a clade consisting of *Ptilocaulis walpersi* and *Myrmekioderma sp.* Despite the lack of resolution at the base of 28S rDNA gene tree, ((Suberitidae+*Spongosorites genitrix*) + (Axi 3 +Agelasidae)) grouping is recovered whatever phylogenetic reconstruction methods are used. The monophyly of Dictyonellidae is not recovered. The polyphyly of the genus *Ptilocaulis* cannot be tested due to the inclusion of only one species.

#### Combined dataset

For the combined dataset, we chose to present the topology resulting from Bayesien analysis, rooted on two *Tetractinellida* P species (Fig. 1C). This topology is consistent with the tree obtained in 18S analyses. However, contrary to the results obtained in the 18S rDNA dataset, the Dictyonellidae family appears polyphyletic with clade Axi 2, consisting of *Axinella cannabina*, *Dictyonella incisa*, *Acanthella acuta* and *Dictyonella pelligera*, at the base of (Axi 1 + (Myrmekioderma sp. + Ptilocaulis walpersi)) and a second clade including *Scopalina* species sister group of ((*Spongosorites genitrix* + Suberitidae) + (Axi 3 +Agelasida)).

#### Predicted secondary structures of 18S

The predicted secondary structures for V4 and V7 regions are presented in Fig. 2A and B. These figures contain only predictions for the three clades of *Axinella* revealed by the previous phylogenetic analysis. V4 and V7 regions present a high substitution rate and variation between *Axinella* species.

For the V4 region (Fig. 2A), the secondary structures are the same for all species of the Axi3 clade; the lower energies are also very similar (from -44.64 to -45.92 kcal/mol). Secondary structures from species pertaining to clade Axi2 are identical except for the basal species *Dictyonella incisa*. The values for the lower energies are also the same for *Acanthella acuta, Axinella cannabina* and *Dictyonella pelligera* (49.22 kcal/mol). In the clade Axi1 no molecular synapomorphy **is** observed. For the V7 region (Fig. 2B), a different secondary structure supported each clade (Axi1, Axi2, Axi3). The lower energy values are the same for

all species belonging to the same clade.

#### DISCUSSION

#### Polyphyly of the genus Axinella

As suspected by previous authors (Solé-Cava and Boury-Esnault, 1999; Alvarez et al., 2000) the genus Axinella is polyphyletic. The type species Axinella polypoides form, within Axi 1, a clade with A. vaceleti, A. infundibuliformis and in 28S A. dissimilis. The presence of A. cannabina within Axi 2 could be interpreted as a misidentification by previous authors. In fact A. cannabina shares with Acanthella acuta the presence of flexuous strongyles and the presence of isocyanides (Braekman et al., 1992). It appears obvious that this species has to be reallocated to the genus Acanthella. Axi 3 is composed of A. damicornis, A. corrugata, A. verrucosa and Cymbastela cantharella. C. cantharella shares with Axinella damicornis and A. verrucosa the presence of pyrroles (Braekman et al., 1992). In the description of Cymbastela Hooper and Bergquist (1992) have pointed out that C. cantharella differs from other Cymbastela "in external coloration, skeletal architecture, specific dimensions of oxeas" and also contains a number of biologically active metabolites absent in other species. We do not have, in our dataset, C. stipitata, the type species of the genus. However in all molecular studies so far, C. stipitata forms a clade with Acanthella species (Alvarez et al., 2000; Erpenbeck et al., 2007). Cymbastela cantharella has to be reallocated to another genus. In the 18SrDNA dataset a species of Ptilocaulis (P fusiformis) is also included in this clade. The three species of Axinella (damicornis, verrucosa and corrugata) need also to be reallocated to another genus. We propose for the clade Axi 3 a new name CymbaxinellaP (for definition see Table 3). The synapomorphy for this clade could be the secondary structure of the V4 and V7 regions of the sequence of the 18S rDNA (Fig. 2). We propose A. damicornis as the typespecies of this new clade. It is necessary in the future to reassess all the Axinella species in order to determine their relationships to these three clades.

#### Polyphyly of the genus Ptilocaulis and its relationships with Desmoxyidae

The type species of *Ptilocaulis* is *P. walpersi*. This species and *P. spiculifer* constitute a well supported clade with 18SrDNA sequences. *Ptilocaulis fusiformis* is included in the clade *Cymbaxinella*<sup>p</sup> and is closely related to *A. damicornis* in 18S dataset. We propose to

reallocate *P. fusiformis* to the clade *CymbaxinellaP*. The genus *Ptilocaulis* appears to be polyphyletic as *Axinella*. The clade *Ptilocaulis P* [*P. walpersi* + *P. spiculifer*] constitutes a well supported clade with *Myrmekioderma*, the only Desmoxyidae species in our dataset. Soest et al. (1990) have included *Ptilocaulis* in the Desmoxyidae, due to the similarities of the surface with *Myrmekioderma*. Our results confirm this hypothesis. Our dataset for this family is too small to draw firm conclusions and in the future the other genera of Desmoxyidae have to be studied. Moreover, all species of *Ptilocaulis* have to be reassessed in order to determine their relationships to the clades *CymbaxinellaP* or *Ptilocaulis P*.

#### The new clade AgelasidaP

Agelas species constitute a well supported clade always recovered in all molecular phylogenies so far (Erpenbeck and Wörheide, 2007). The clade *Cymbaxinella P* constitutes a well supported clade with the clade *Agelas P*. Since the work of Lafay et al. (1992) the close relationships between several "*Axinella*" species and Agelasidae has always been recovered (Chombard et al., 1997; Nichols, 2005; Erpenbeck et al., 2007). The phylogenetic hypothesis proposed by Braekman et al. (1992) on the basis of the presence of pyrroles is congruent with the molecular hypothesis. We propose for this clade the name *Agelasida P* with a new definition following the *PhyloCode* (Table 3).

#### Polyphyly of the family Axinellidae

Our dataset includes species belonging to four of the nine genera of the Axinellidae. For the time being the clade *Axinellidae* P includes *Axinella polypoides* and other close species of *Axinella* [*A. aruensis* in 28SrDNA, *A. dissimilis, A. infundibuliformis, A. vaceleti*] and *Dragmacidon* species [*D. reticulatum*+ *D. aff. mexicana* in 28SrDNA]. It should also include the genus *Phakellia* but very few sequences are available (Erpenbeck et al., 2007). The genus *Cymbastela,* except *C. cantharella* which is now included in the clade *Cymbaxinella P*, seems to have close relationships with *Acanthella P* clade (Erpenbeck et al., 2007). The phylogenetic relationship between the clade (*Ptilocaulis* P + *Myrmekioderma*) and the clade *Axinellidae P* is very weak with our data set. The genus *Reniochalina* (type-species *R. stalagmites*) is included in a clade of Raspailiidae (Erpenbeck et al., 2007). As assumed by Erpenbeck and Wörheide, (2007) the family Axinellidae as traditionally defined is polyphyletic and the genus *Phycopsis, Auletta* and *Pararhaphoxya* will need to be studied as a
basis for developing a hypothesis regarding a monophyletic family Axinellidae.

#### Paraphyly or polyphyly of the family Dictyonellidae

The family Dictyonellidae is not supported as already shown in several molecular phylogenies (Erpenbeck and Wörheide, 2007). The species of *Scopalina* constitutes a well supported clade whereas the *Dictyonella* species relationships have not been determined. They are included in the clade *Acanthella*P but the two species of the datasets (*D. pelligera* and *D. incisa*) are not monophyletic. A detailed study of all *Dictyonella* species, including the type-species is required as has been done recently for *Scopalina* (Blanquer and Uriz, 2008). Our molecular tree suggests that in fact *Dictyonella* species might perhaps be better reallocated to *Acanthella* genus.

## **CONCLUSION**

The species of "Axinella" of our datasets belong to three clades. The first clade, named Axinellidae p, included the type species of the genus A. polypoides and three or four Axinella species, depending on the dataset, and Dragmacidon species. Axinella cannabina is not an Axinella and is reallocated to Acanthella<sup>P</sup>. The last three species in the dataset are A. damicornis, A. verrucosa and A. corrugata which constitute with Cymbastela cantharella and in 18S Ptilocaulis fusiformis the new clade Cymbaxinella P. A good synapomorphy for these three clades are the V7 secondary structures of the 18SrDNA, as well as the V4 secondary structure for Cymbaxinella<sup>p</sup>. Except for Acanthella<sup>p</sup> cannabina which shares clear morphological characters with Acanthella acuta, it is absolutely essential to carefully reassess all the morphological characters and particularly the organisation of the skeleton in order to be able to identify the species belonging to Cymbaxinella<sup>p</sup> or Axinellidae<sup>p</sup>. Further work is required to establish the relationships of all "Axinella" species and to better understand the members of the Axinellidae and its phylogenetic relationships with the Raspailiidae. It is also urgently necessary to find other data sets of characters. The morphological characters have to be reassessed in the light of the molecular phylogeny. A search for other characters based on cytology, embryology and secondary metabolites would be helpful as a basis for future progress. However, we have to keep in mind that "no single dataset, molecular or morphological, can reasonably be expected to be the Holy Grail of phylogenetics" (Jenner 2004) and this is especially true for the Halichondrida.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank the diving service of Centre d'Océanologie de Marseille for help in specimen collection in the Marseille area, Daniel Laurent (IRD) for providing specimens from Solomon Island, Thierry Perez, Jean Vacelet and Pierre Chevaldonné for providing specimens from New Caledonia, Croatia, and North Atlantic. A part of this work was supported by the ANR ECIMAR. We thank Jean Vacelet and Thierry Perez for useful discussions all along this work. The English language has been revised by Michael Paul.

### REFERENCES

Alvarez, B., Hooper, J.N.A., 2002. Family Axinellidae Carter, 1875. In: Hooper, J.N.A., Soest, R.W.M.van, (Eds.), Systema Porifera: A guide to the Classification of Sponges. vol. 1. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 724-747.

Alvarez, B., Soest, R.M.W.van, Rützler, K., 1998. A revision of the Axinellidae (Porifera: Demospongiae) of the Central West Atlantic region. Smithson. Contrib. Zool. 598, 1-47.

Alvarez, B., Crisp, M.D., Driver, F., Hooper, J.N.A., Soest, R.W.M.van, 2000. Phylogenetic relationships of the family Axinellidae (Porifera: Demospongiae) using morphological and molecular data. Zool. Scr. 29, 169-198.

Blanquer, A., Uriz, M.J., 2008. '*A posteriori*' searching for phenotypic characters to describe new cryptic species of sponges revealed by molecular markers (Dictyonellidae: *Scopalina*). Invertebrate Systematics 22, 489-503.

Borchiellini, C., Manuel, M., Alivon, E., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Le Parco, Y., 2001. Sponge paraphyly and the origin of Metazoa. J. Evol. Biol. 14, 171-179.

Borchiellini, C., Chombard, C., Manuel, M., Alivon, E., Vacelet, J., Boury-Esnault, N., 2004. Molecular phylogeny of Demospongiae: implications for classification and scenarios of character evolution. Molecular Phylogenetics and Evolution 32, 823-837.

Borojevic, R., Cabioch, L., Lévi, C., 1968. Inventaire de la faune marine de Roscoff: Spongiaires. Editions de la station biologique de Roscoff, Vol. . Robin & Mareuge, Paris.

Braekman, J.-C., Daloze, D., Stoller, C., Soest, R.W.M.van, 1992. Chemotaxonomy of *Agelas* (Porifera: Demospongiae). Biochem. Syst. Ecol. 20, 417-431.

Cárdenas, P., Rapp, H.T., Schander, C., Tendal, O.S., 2009. Molecular taxonomy and phylogeny of the Geodiidae (Porifera, Demospongiae, Astrophorida) - combining phylogenetic and Linnaean classification. Zool. Scr.

Carter, H.J., 1875. Notes introductory to the study and classification of the Spongida. Ann. Mag. nat. Hist. 4, 1-40, 126-145, 177-200.

Cavalier-Smith, T., Allsopp, M.T.E.P., Chao, E.E., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., 1996. Sponge phylogeny, animal monophyly, and the origin of the nervous system : 18S rRNA evidence. Can. J. Zool. 74, 2031-2045.

Chombard, C., Tillier, A., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., 1997. Polyphyly of "sclerosponges" (Porifera, Demospongiae) supported by 28S ribosomal sequences. Biol. Bull. (Woods Hole) 193, 359-367.

Chombard, C., Boury-Esnault, N., Tillier, S., 1998. Reassesment of homology of morphological

characters in tetractinellid sponges based on molecular data. Syst. Biol. 47, 351-366.

Christen, R., Ratto, A., Baroin, A., Perasso, R., Grell, K.G., Adoutte, A., 1991. An analysis of the origin of metazoans, using comparisons of partial sequences of the 28S rRNA, reveals an early emergence of triploblasts. Embo J. 10, 499-503.

Collins, A.G., 1998. Evaluating multiple alternative hypotheses for the origin of bilateria: An analysis of 18S rRNA molecular evidence. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95, 15458-15463.

Erpenbeck, D. 2004. On the phylogney of Halichondrid demosponges. Doctor Thesis, Universiteit van Amsterdam.

Erpenbeck, D., Wörheide, G., 2007. On the molecular phylogeny of sponges (Porifera). Zootaxa 1668, 107-126.

Erpenbeck, D., McCormack, G.P., Breeuwer, J.A.J., Soest, R.W.M.van, 2004. Order level differences in the structure of partial LSU across demosponges (Porifera): new insights into an old taxon. Molecular Phylogenetics and Evolution 32, 388-395.

Erpenbeck, D., Breeuwer, J.A.J., Soest, R.W.M.van, 2005. Implications from a 28S rRNA gene fragment for the phylogenetic relationships of halichondrid sponges (Porifera:Demospongiae). Jzs 43, 93-99.

Erpenbeck, D., List-Armitage, S.E., Alvarez, B., Degnan, B., Wörheide, G., Hooper, J.N.A., 2007. The systematics of Raspailiidae (Demospongiae: Poecilosclerida: Microcionina) reanalysed with a ribosomal marker. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 87, 1571-1576.

Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst. Biol. 52, 696-704.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium 41, 95-98.

Hillis, D.M., Bull, J.J., 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. Syst. Biol. 42, 182-192.

Holmes, B., Blanch, H., 2007. Genus-specific associations of marine sponges with group I crenarchaeotes. Mar. Biol. 150, 759-772.

Hooper, J.N.A., Bergquist, P.R., 1992. *Cymbastela*, a new genus of lamellate coral reef sponges. Mem. Queensl. Mus. 32, 99-137.

Hooper, J.N.A., Soest, R.W.M.van, 2002. Systema Porifera : A Guide to the Classification on Sponges. In: Hooper, J.N.A., Soest, R.W.M.van, (Eds.), Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges. vol. 1. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 1-3.

Huelsenbeck, J., Rannala, B., 2004. Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. Syst. Biol. 53, 904-913.

Jenner, R.A., 2004. When molecules and morphology clash: reconciling conflicting phylogenies of the Metazoa by considering secondary character loss. Evolution & Development 6, 372-378.

Lafay, B., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Christen, R., 1992. An analysis of partial 28S ribosomal RNA sequences suggests early radiations of sponges. Biosystems 28, 139-151.

Lavrov, D., Wanga, X., Kelly, M., 2008. Reconstructing ordinal relationships in the Demospongiae using mitochondrial genomic data. Molecular Phylogenetics and Evolution 49, 111-124.

Lévi, C., 1973. Systématique de la classe des Demospongiaria (Démosponges). In: Grassé, P.P., (Ed.), Spongiaires. vol. 3(1). Masson & C°, Paris, pp. 577-632.

Manuel, M., Borchiellini, C., Alivon, E., Le Parco, Y., Vacelet, J., Boury-Esnault, N., 2003. Phylogeny and Evolution of Calcareous Sponges: Monophyly of Calcinea and Calcaronea, High Level of Morphological Homoplasy, and the Primitive Nature of Axial Symmetry. Syst. Biol. 52, 311-333.

Medina, M., Collins, A.G., Silberman, J.D., Sogin, M.L., 2001. Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98, 9707-9712.

Nichols, S.A., 2005. An evaluation of support for order-level monophyly and interrelationships within the class Demospongiae using partial data from the large subunit rDNA and cytochrome oxidase subunit I. Molecular Phylogenetics and Evolution 34, 81-96.

Redmond, N.E., McCormack, G.P., 2008. Large expansion segments in 18S rDNA support a new sponge clade (Class Demospongiae, Order Haplosclerida). Molecular Phylogenetics and Evolution 47, 1090-1099.

Ridley, O.S., Dendy, A., 1887. Report on the Monaxonida collected by H.M.S. Challenger during the years 1873-1876. Report on the Scientific Results of the voyage of H.M.S. Challenger, Vol. 20. Majesty's stationery Office, London.

Schmidt, O., 1862. Die Spongien des Adriatischen Meeres. Wilhelm Engelmann, Leipzig.

Soest, R.W.M.van, Díaz, M.C., Pomponi, S., 1990. Phylogenetic classification of the Halichondrids (Porifera, Demospongiae). Beaufortia 40, 15-62.

Soest, R.W.M.van, Boury-Esnault, N., Hooper, J.N.A., Rützler, K., Voogd, N.J.de, Alvarez, B., Hajdu, E., Pisera, A.B., Vacelet, J., Manconi, R., Schoenberg, C., Janussen, D., Tabachnick, K.R., Klautau, M. World Porifera database. Available online at http://www.marinespecies.org/porifera.

Solé-Cava, A.M., Boury-Esnault, N., 1999. Patterns of intra and interspecific divergence in marine sponges. Mem. Queensl. Mus. 44, 591-602.

Sperling, E.A., Peterson, K.L., Pisani, D., 2009. Phylogenetic-signal dissection of nuclear housekeeping genes supports the paraphyly of sponges and the monophyly of Eumetazoa. Mol. Biol. Evol. (in press)

Swofford, D.L. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucl. Acids Res. 25, 4876-4882.

Wuyts, J., Van De Peer, Y., Winkelmans, T., De Watchter, R., 2002. The European database on small subunit ribosomal RNA. Nucl. Acids Res. 30, 183-185.

Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucl. Acids Res. 31, 3406-3415.

## LEGENDS

## Table 1

Comparison of the classification of Axinellida and Halichondrida following Lévi, 1973 and Hooper and Soest, 2002.

#### Table 2

List of species used in this work following the classification of Systema Porifera (Hooper and Soest, 2002) and the recent updating undertaken in the World Porifera Database (Soest et al., 2008). The collection site, the GenBank number of the 18 and 28S rDNA sequences and the references link to the sequences are indicated. In the species name column, in bold, is the type-species of the genus if it is included in the dataset. In the sequences column, the new sequences are also in bold.

\* In GenBank the taxonomy is not updated and the identification of the species not always performed by a taxonomist. This has been responsible for a lot of bias. We have given here, whenever possible, the name accepted by the World Porifera Database (Soest et al., 2008; http://www.marinespecies.org/porifera/). For example the sequence of *Dragmacidon reticulatum* is named in GenBank *Pseudaxinella lunaecharta*. This specimen has been collected in the Caribbean area. *P. luneacharta* is a species restricted to the East Atlantic (African coast) and the species of West Atlantic (Caribbean area) is *P. reticulatum* (Alvarez et al., 1998). Moreover it has been shown in Systema Porifera that *Pseudaxinella* species has to be reallocated to *Axinella* or *Dragmacidon*. Another example of the importance of indicating the collecting site of a species is *Axinella polypoides*. This Mediterranean species is often confused with *Axinella dissimilis* from the North-Atlantic and the Channel (Borojevic et al 1968).

## Table 3

Definition of the clade names following the principles and rules of the *PhyloCode v.4b* (<u>http://www.ohiou.edu/PhyloCode/</u>).

## Figure 1

A. Tree resulting from the analyses of the 18S rRNA dataset. The topology presented corresponds to the ML analysis. Bootstrap values (when >50%) are indicated above the

principal nodes. B. Tree resulting from the analyses of the 28S rRNA dataset. The topology presented corresponds to the MP analysis. C. Tree resulting from the analyses of the combined dataset (18S+28S). The topology presented corresponds to the Bayesian analysis. Bootstrap values (when >50%) are indicated above the principal nodes. The four numbers are from top to bottom: bootstrap values for NJ, MP, ML and posterior probabilities for BI. The tree is rooted on *TetractinellidaP*. The three clades of *Axinella* are mentioned as Axi1, Axi2 and Axi3.

### Figure 2

A. Representation of the secondary structure predictions of the 18S rRNA V4 region mapped on the *Axinella* clades topology. Conserved secondary structures for a clade are indicated by a black dot. dG values correspond to the secondary structure formation enthalpies (according to MFold).

B. Representation of the secondary structure predictions of the 18S rRNA V7 region mapped on the *Axinella* clades topology. Conserved secondary structures for a clade are indicated by a black dot. dG values correspond to the secondary structure formation enthalpies (according to MFold).

Figure 1A:



Figure 1B:



Figure 1C:







Figure 2B:



## Table 1

Lévi, 1973		Hooper & Van Soest, 2002				
AXINELLIDA	Axinellidae	HALICHONDRIDA	Axinellidae			
	Axinella		Axinella			
	Auletta		Auletta			
	Axinosia		=Axinella			
	Dragmacidon		Dragmacidon			
	Phakellia		Phakellia			
	Phycopsis		Phycopsis			
	Pseudaxinella		= Dragmacidon			
	Ptilocaulis		Ptilocaulis			
	Tragosia		=Axinella			
	11080510		Cymbastela			
			Pararhanhorya			
			Reniochalina			
	Acanthella		Dictyonellidae			
	Thringcophorg		Dictyoneniuae			
	Bubaridao	[I OECILOSCLEKIDA]	Rubaridaa			
	Dubaria		Dubariuae			
	Dubaris		Dubaris Mana ang i diang			
	Monocrepiaium		Monocrepidium			
			Cerbaris			
			Hymerhabdia			
	Desmoxyidae		Desmoxyidae			
	Desmoxya		= Higginsia ?			
	Higginsia		Higginsia			
	Parahigginsia		Parahigginsia			
	Halicnemia		Halicnemia			
			Acanthoclada			
			Didiscus			
			Heteroxya			
			Myrmekioderma			
			Dictyonellidae			
			Acanthella			
			Dictyonella			
			Liosina			
			Lipastrotethya			
			Phakettia			
			Rhaphoxya			
			Scopalina			
-			Svenzea			
			Tethyspira			
	Hemiasterellidae	[HADROMERIDA]	Hemiasterellidae			
	Hemiasterella	[]	Hemiasterella			
-	Adreus		Adreus			
	Paratimea		Paratimea			
-	Stelligera		Stelligera			
	Stettigeru		Aros			
			Iontogastra			
	Trachveladidaa	[HADROMEDIDA]	Trachveladidaa			
	Trachycladus	ITADKOMEKIDAJ	Trachycladus			
	Trachyciaads		Rhanhidhistia			
	Phahdaramiidaa		Phahdaramiidaa			
	Dhahdayaria	[1 UECILUSCLEKIDA]	Dhahdanaria			
	Sigmovir allida a		Desmocollida			
	Sigmaxineilidae	[POECILOSCLERIDA]	Desmacellidae			
	Sigmaxinella		Sigmaxineila			
	Sigmaxia		= Sigmaxinella			
			Desmacella			

			Biemna
	Raspailiidae	[POECILOSCLERIDA]	Raspailiidae
	Raspailia		Raspailia
	Raspaxilla		Raspaxilla
	Endectyon		Endectyon
	Echinodictyum		Echinodictyum
	Raspaciona		Raspaciona
	Euryponidae	[POECILOSCLERIDA]	= Raspailiidae
	Eurypon		Eurypon
	Acantheuryppon		= Eurypon
	Tricheurypon		Tricheurypon
	Cyamon		Cyamon
	Trikentrion		Trikentrion
			Ectyoplasia
HALICHONDRIDA	Halichondriidae		Halichondriidae
	Halichondria		Halichondria
	Trachyopsis		= Halichondria
	Ciocalypta		Ciocalypta
	Amorphinopsis		Amorphinopsis
	Hymeniacidonidae		= Halichondriidae
	Prostylissa		=Amorphinopsis
	Hymeniacidon		Hymeniacidon
	Stylinos		=Hymeniacidon
			Axinyssa
			Spongosorites
			Topsentia
			Epipolasis
	Dictyonella		[Dictyonellidae]
	Semisuberites	[POECILOSCLERIDA]	[Esperiopsidae]
	Ulosa	[POECILOSCLERIDA]	[Esperiopsidae]
POECILOSCLERIDA	Agelasidae	AGELASIDA	Agelasidae
	Agelas		Agelas

## **SEQUENCES 18 & 28S**

Genbank n°         AgeLASIDA         Agelasidae       Verrill, 1907         Agelas clathrodes       (Schmidt, 1870)       Bahamas       AY769087       Richelle-Maurer and Van de Vyver         Direct       submission         Agelas conifera       (Schmidt, 1870)       Bahamas       AY734443       Richelle-Maurer and Van de Vyver         Agelas dispar       Duchassaing & Michelotti, 1864       Bahamas       AY737640       Richelle-Maurer and Van de Vyver         Agelas oroides       (Schmidt, 1862)       NW Mediterranean       AY348886       Richelle-Maurer and Van de Vyver         Agelas sp.       EF654520       Kober and Nichols       Vyver Direct submission         Agelas sp.       EF654520       Kober and Nichols       Direct submission         HALICHONDRIDA       Axinella aruensis       Hentschel, 1912       Timor Sea       -         Axinella conrugata       (Georges & Wilson, 1919)       Bahamas       AY737637       Richelle-Maurer and Van de Vyver         Axinella damicornis       (Esper, 1794)       Sape scave, NW Mediterranean;       AY348887       Borchiellini et al 2004	Genbank n° AY864739 AY864738 AY864740 AJ225830	Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct
AgeLasiDa       Verrill, 1907         Agelas clathrodes       (Schmidt, 1870)       Bahamas       AY769087       Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission         Agelas conifera       (Schmidt, 1870)       Bahamas       AY734443       Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission         Agelas conifera       (Schmidt, 1870)       Bahamas       AY734443       Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission         Agelas dispar       Duchassaing & Michelotti, 1864       Bahamas       AY737640       Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission         Agelas oroides       (Schmidt, 1862)       NW Mediterranean       AY348886       Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission         Agelas oroides       (Schmidt, 1862)       NW Mediterranean       AY348886       Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission         Agelas sp.       EF654520       Kober and Nichols Direct submission       Nichols Direct submission         Agelas sp.       EF654520       Kober and Nichols Direct submission         Axinella aruensis       Hentschel, 1912       Timor Sea       -         Axinella conrugata       (Georges & Wilson, 1919)       Bahamas       AY737637       Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission         Axinella damicornis       (Esper, 1794)       Croatic, Dugi Otok, Aritatique       AY737637       R	AY864739 AY864738 AY864740 AJ225830	Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct
Agelasidae       Verrill, 1907         Agelas clathrodes       (Schmidt, 1870)       Bahamas       AY769087       Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission         Agelas conifera       (Schmidt, 1870)       Bahamas       AY734443       Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission         Agelas dispar       Duchassaing & Michelotti, 1864       Bahamas       AY737640       Richell-Maurer and Van de Vyver Direct submission         Agelas oroides       (Schmidt, 1862)       NW Mediterranean       AY348886       Richell-Maurer and Van de Vyver         Agelas oroides       (Schmidt, 1862)       NW Mediterranean       AY348886       Richell-Maurer and Van de Vyver         Jireet       submission       Agelas sp.       EF654520       Kober and Nichols       Direct submission         Agelas sp.       EF654520       Kober and Nichols       Direct submission       Direct submission         Axinella aruensis       Hentschel, 1912       Timor Sea       -       -         Axinella corrugata       (Georges & Wilson, 1919)       Bahamas       AY737637       Richelle-Maurer and Van de Vyver         Submission       Effect scuper       Guerer and Van de Vyver       -       -         Axinella corrugata       (Georges & Wilson, 1919)       Bahamas       AY737637       Richelle-Maurer and Van de Vyv	AY864739 AY864738 AY864740 AJ225830	Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct
Agelas clathrodes       (Schmidt, 1870)       Bahamas       AY769087       Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission         Agelas conifera       (Schmidt, 1870)       Bahamas       AY734443       Richelle-Maurer and Van de Vyver         Agelas dispar       Duchassaing & Michelotti, 1864       Bahamas       AY737640       Richelle-Maurer and Van de Vyver         Agelas oroides       (Schmidt, 1862)       NW Mediterranean       AY348886       Richelle-Maurer and Van de Vyver         Agelas sp.       (Schmidt, 1862)       NW Mediterranean       AY348886       Richelle-Maurer and Van de Vyver         Agelas sp.       (Schmidt, 1862)       NW Mediterranean       AY348886       Richelle-Maurer and Van de Vyver         Agelas sp.       (Schmidt, 1862)       NW Mediterranean       AY348886       Richelle-Maurer and Van de Vyver         Arinella aruensis       Hentschel, 1912       Timor Sea       -       -         Axinella cannabina       (Esper, 1794)       Croatic, Dugi Otok, Adriatique       GQ466049       This paper         Axinella corrugata       (Georges & Wilson, 1919)       Bahamas       AY737637       Richelle-Maurer and Van de Vyver         Submission       Arinella damicornis       (Esper, 1794)       State, Dugi Otok, Adriatique       AY348887       Borchiellini et al 2004 <td>AY864739 AY864738 AY864740 AJ225830</td> <td>Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct</td>	AY864739 AY864738 AY864740 AJ225830	Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct
Agelas conifera(Schmidt, 1870)BahamasAY734443Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submissionAgelas disparDuchassaing & Michelotti, 1864BahamasAY737640Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submissionAgelas oroides(Schmidt, 1862)NW MediterraneanAY348886Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submissionAgelas oroides(Schmidt, 1862)NW MediterraneanAY348886Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submissionAgelas sp.EF654520Kober and Nichols Direct submissionHALICHONDRIDACroatie, Dugi Otok, AdriatiqueGQ466049This paper and Van de Vyver Direct submissionAxinella cannabina(Esper, 1794)Croatie, Dugi Otok, AdriatiqueGQ466049This paper and Van de Vyver Direct submissionAxinella damicornis(Esper, 1794)3PPs cave, NW Mediterranean;AY348887 AY348887Borchiellini et al 2004	AY864738 AY864740 AJ225830	Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct
Agelas disparDuchassaing & Michelotti, 1864BahamasAY737640Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submissionAgelas oroides(Schmidt, 1862)NW MediterraneanAY348886Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submissionAgelas oroides(Schmidt, 1862)NW MediterraneanAY348886Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submissionAgelas sp.EF654520Kober and Nichols Direct submissionHALICHONDRIDAAxinellidaeCarter, 1875Axinella aruensisHentschel, 1912Timor SeaAxinella conrugata(Georges & Wilson, 1919)BahamasAY737637Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submissionAxinella damicornis(Esper, 1794)SPPs cave, NW Mediterranean;AY348887Borchiellini et al 2004	AY864740 AJ225830	Direct submission Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct
Agelas disparDuchassang & Michelotti, 1864BahamasAY737640Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submissionAgelas oroides(Schmidt, 1862)NW MediterraneanAY348886Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submissionAgelas oroides(Schmidt, 1862)NW MediterraneanAY348886Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submissionAgelas sp.EF654520Kober and Nichols Direct submissionHALICHONDRIDAAxinella aruensisHentschel, 1912Timor SeaAxinella cannabina(Esper, 1794)Croatie, Dugi Otok, AdriatiqueGQ466049This paper and Van de Vyver Direct submissionAxinella damicornis(Esper, 1794)SPPs cave, NW Mediterranean;AY348887Borchiellini et al 2004	AY864740 AJ225830	Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct
Agelas oroides(Schmidt, 1862)NW MediterraneanAY348886Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submissionAgelas sp.EF654520Kober and Nichols Direct submissionAgelas sp.EF654520Kober and Nichols Direct submissionHALICHONDRIDAAxinella aruensisHentschel, 1912Timor Sea-Axinella cannabina(Esper, 1794)Croatie, Dugi Otok, AdriatiqueGQ466049This paperAxinella corrugata(Georges & Wilson, 1919)BahamasAY737637Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submissionAxinella damicornis(Esper, 1794)3PPs cave, NW Mediterranean;AY348887Borchiellini et al 2004	AJ225830	submission
Agelas sp.EF654520Kober and Nichols Direct submissionHALICHONDRIDACarter, 1875Axinella aruensisHentschel, 1912Timor Sea-Axinella cannabina(Esper, 1794)Croatie, Dugi Otok, AdriatiqueGQ466049This paperAxinella corrugata(Georges & Wilson, 1919)BahamasAY737637Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submissionAxinella damicornis(Esper, 1794)3PPs cave, NW Mediterranear;AY348887Borchiellini et al 2004		Borchiellini et al 2004
HALICHONDRIDA         Axinellidae       Carter, 1875         Axinella aruensis       Hentschel, 1912       Timor Sea       -       -         Axinella cannabina       (Esper, 1794)       Croatie, Dugi Otok, Adriatique       GQ466049       This paper         Axinella corrugata       (Georges & Bahamas       AY737637       Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission         Axinella damicornis       (Esper, 1794)       3PPs cave, NW Mediterranear;       AY348887       Borchiellini et al 2004	AY561929	Nichols, 2005
Axinellidae       Carter, 1875         Axinella aruensis       Hentschel, 1912       Timor Sea       -         Axinella cannabina       (Esper, 1794)       Croatie, Dugi Otok, Adriatique       GQ466049       This paper         Axinella corrugata       (Georges & Bahamas       AY737637       Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission         Axinella damicornis       (Esper, 1794)       3PPs cave, NW Mediterranean;       AY348887       Borchiellini et al 2004		
Axinella aruensis       Hentschel, 1912       Timor Sea       -       -         Axinella cannabina       (Esper, 1794)       Croatie, Dugi Otok, Adriatique       GQ466049       This paper         Axinella corrugata       (Georges & Wilson, 1919)       Bahamas       AY737637       Richelle-Maurer and Van de Vyver         Direct       submission         Axinella damicornis       (Esper, 1794)       3PPs cave, NW Mediterranean;       AY348887       Borchiellini et al 2004		
Axinella cannabina       (Esper, 1/94)       Croatle, Dugr Otok, Adriatique       GQ466049       This paper         Axinella corrugata       (Georges & Bahamas       AY737637       Richelle-Maurer and Van de Vyver         Wilson, 1919)       Direct submission         Axinella damicornis       (Esper, 1794)       3PPs cave, NW Mediterranean;       AY348887       Borchiellini et al 2004	DQ299253	Holmes and Blanch 2007
Axinella corrugata       (Georges & Banamas       AY/3/63/       Richelle-Matter         Wilson, 1919)       and Van de       Vyver         Direct       submission         Axinella damicornis       (Esper, 1794)       3PPs cave, NW       AY348887       Borchiellini et         al 2004	GQ466062	This paper
Axinella damicornis(Esper, 1794)3PPs cave, NWAY348887Borchiellini etMediterranean;al 2004	A Y 804/41	and Van de Vyver Direct submission
Irlande	GQ466058	This paper
Axinella dissimilis (Bowerbank, Eire 1866)	GQ466059	This paper
Axinella(Linnaeus, 1759)EireGQ466051This paperinfundibuliformis	GQ466061	This paper
Axinella polypoides         Schmidt, 1862         3PPs cave, NW         APU43190         Cavalier-Smith et al. 1996	AY348891	Borchiellini et al 2004
Axinella vaceleti Pansini, 1983 Coral Cave, NW GQ466048 This paper Mediterranean	GQ466060	This paper
Axinella verrucosa (Esper, 1794) 3PPs cave, NW GQ466050 This paper Mediterranean	GQ466063	This paper
aff.mexicana (De Laudenieis, Santa Barbara,	DQ299257	Blanch 2007
Dragmacidon (Ridley & Dendy, Florida AY734442 Richelle-Maurer reticulatum. 1886) River and Van de Vyver Direct submission	AY864742	Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission
Ptilocaulis walpersi       (Duchassaing & Michelotti, 1864)       Bahamas       AY737638       Richelle-Maurer and Van de Vyver         Direct submission	AY864743	Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission
Ptilocaulis spiculifer(Lamarck, 1813)Solomon Is.GQ466054This paper		

Ptilocaulis fusiformis	Lévi, 1967	Noumea, New Caledonia	GQ466055	This paper	-	-
Cymbastela	(Lévi, 1983)	Noumea, New	GQ466056	This paper	GQ466064	This paper
cantharella		Caledonia				
Desmoxyidae	Hallmann, 1917					
Myrmekioderma sp		Solomon Is	GQ466053	This paper	GQ466066	This paper
Dictyonellidae	Soest et al, 1990					
Acanthella acuta	Schmidt, 1862	Coral Cave, NW Mediterranean	GQ466052	This paper	GQ466067	This paper
Dictyonella incisa	(Schmidt, 1880)	Jarre Cave, NW Mediterranean	AY348880	Borchiellini et al 2004	X57261	Christen et al. 1991
Dictyonella pelligera	(Schmidt, 1864)	Jarre Cave, NW Mediterranean	GQ466057	This paper	GQ466065	This paper
Scopalina blanensis	Blanquer & Uriz, 2007	Blanes, NW Mediterranean	AM498652	Blanquer and Uriz, 2008	AM498662	Blanquer and Uriz, 2008
Scopalina canariensis	Blanquer & Uriz, 2007	Canary Islands	AM498653	Blanquer and Uriz, 2008	AM498664	Blanquer and Uriz, 2008
Scopalina ceutensis	Blanquer & Uriz, 2007	Ceuta, Gibraltar Strait	AM498655	Blanquer and Uriz, 2008	-	-
Scopalina Jophyropoda	Schmidt, 1867	NW Mediterranean	AM498650	Blanquer and Uriz, 2008	AM498660	Blanquer and Uriz, 2008
Scopalina ruetzleri	(Wiedenmayer, 1977)		AJ621546	Nie et al Direct submission	AM498666	Blanquer and Uriz, 2008
Halichondridae	Gray, 1867					
Spongosorites genitrix	(Schmidt, 1870)	NW Mediterranean	AY348885	Borchiellini et al 2004	X57260	Christen et al 1991
HADROMERIDA						
Suberitidae	Schmidt, 1870					
Suberites ficus	(Johnston, 1862)		AF100947	Collins 1998	AY026381	Medina et al 2001
Suberites domuncula	(Olivi, 1792)	Adriatic Sea	AJ620112	Cetkovic et al Direct submission	AJ620113	Cetkovic et al Direct submission
Rhizaxinella sp.			EF654531	Kober and Nichols Direct submission	AY561910	Nichols, 2005
TETRACTINELLIDA						
Geodiidae	Gray, 1867					
Geodia cydonium	(Jameson, 1911)	Anse des Cuivres, NW Mediterranean	AY348878	Borchiellini et al 2004	AY348893	Borchiellini et al 2004
Sidonops neptuni	(Sollas, 1888)		AY737635	Richelle-Maurer and Van de Vyver Direct submission		
Theonellidae	Lendenfeld, 1903					
Discodermia sp.	(Bowerbank, 1869	3PPs cave, NW Mediterranean	AJ224647	McInerney Direct submission	AF062603	Chombard et al 1998
Corallistidae	Sollas, 1888					
Corallistes masoni	(Bowerbank, 1869)	3PPs cave, NW Mediterranean	-	-	AF062602	Chombard et al 1998

## Table 3

*Acanthella<sup>p</sup>* (nomen cladi conversum ex Acanthella Schmidt, 1862). Node based: the least inclusive clade containing Acanthella<sup>p</sup> acuta and Acanthella<sup>p</sup> cannabina.

*Agelas<sup>p</sup>* (*nomen cladi conversum ex Agelas* Duchassaing and Michelotti, 1864). Node based: the least inclusive clade containing *Agelas<sup>p</sup> oroides*, *Agelas<sup>p</sup> conifera* and *Agelas<sup>p</sup> clathrodes*.

*Agelasida<sup>p</sup>* (*nomen cladi conversum ex* Agelasida Hartman, 1980). Node based: the least inclusive clade containing *Agelas<sup>p</sup> oroides* and *Cymbaxinella<sup>p</sup> damicornis*.

Axinellidae (nomen cladi conversum ex Axinellidae Carter, 1875) Branch based: the most inclusive clade containing Axinella polypoides, but not Cymbaxinella<sup>p</sup> damicornis and Acanthella<sup>p</sup> cannabina

*Cymbaxinella<sup>p</sup>* (nomen cladi novum). Branch based: the most inclusive clade containing *Cymbaxinella<sup>p</sup>* damicornis but not *Axinella polypoides* and *Acanthella<sup>p</sup>* cannabina.

*Demospongiae<sup>p</sup>* (*nomen cladi conversum ex* Demospongiae Sollas,1885). Node based: the least inclusive clade containing *Haliclona mediterranea, Geodia cydonium, Spongia officinalis* and *Chondrosia reniformis* (Borchiellini et al., 2004).

*Keratosa<sup>p</sup>* (*nomen cladi conversum ex* Keratosa Bowerbank, 1864). Branch based: the most inclusive clade containing *Spongia officinalis* and not *Aplysina cavernicola*, *Haliclona mediterranea* and *Geodia cydonium*.

*Myxospongiae<sup>p</sup> (nomen cladi conversum ex* Myxospongiae Zittel, 1878). Node based: the least inclusive clade containing *Aplysina cavernicola, Chondrosia reniformis, Hexadella racovitzai* and *Thymosia guernei*.

*Ptilocaulis<sup>p</sup>* (nomen cladi conversum ex *Ptilocaulis* Carter, 1883). Node based: the least inclusive clade containing *Ptilocaulis<sup>p</sup>* walpersi and *Ptilocaulis<sup>p</sup>spiculifer*.

*Scopalina<sup>p</sup>* (*nomen cladi conversum ex Scopalina* Schmidt, 1862). Node based: the least inclusive clade containing *Scopalina<sup>p</sup> lophyropoda*, *Scopalina<sup>p</sup> ruetzleri* and *Scopalina<sup>p</sup> blanensis*.

*Tetractinellida<sup>p</sup>* (*nomen cladi conversum ex* Tetractinellida Marshall, 1876). Apomorphy based: the clade stemming from the first species to possess tetractines synapomorphic with those of *Geodia cydonium* (Borchiellini et al., 2004).

## ANNEXE II

Article 8: *T-box* gene from the homoscleromorph sponge *Oscarella* sheds light on the origin of multilayered animals

Ce travail dont je suis 2<sup>e</sup> auteur a fait l'objet d'un article de recherche actuellement en cours de révisions pour la revue Evolution et Development

# T-box gene from the homoscleromorph sponge *Oscarella* sheds light on the origin of multilayered animals.

Pascal Lapébie<sup>1</sup>, Eve Gazave<sup>1</sup>, Emmanuelle Renard<sup>1</sup>, Chantal Mahé-Bézac<sup>2</sup>, Alexander V. Ereskovsky<sup>1,3</sup> and Carole Borchiellini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre d'Océanologie de Marseille, Aix-Marseille Université, CNRS-UMR 6540, Station marine d'Endoume, 13007 Marseille, France;

<sup>2</sup>Centre d'Océanologie de Marseille, Aix-Marseille Université, CNRS–UMS 2196, Station marine d'Endoume, 13007 Marseille, France.

<sup>3</sup>Department of Embryology, Biological and Soil Sciences Faculty, St Petersburg State University St Petersburg 199034 Russia.

Corresponding author: Carole Borchiellini, Email: <u>carole.borchiellini@univmed.fr</u> Tel: +33 4 91 04 16 49, Fax: +33 4 91 04 16 35

## Abstract

Sponges branch basally in the metazoan phylogenetic tree and are thus well positioned to provide insights into the evolution of mechanisms controlling animal development, likely to remain active in adult sponges. Of the four sponge clades, the Homoscleromorpha are of particular interest for investigations into the origin of animal layers as they alone show "true" epithelia and diploblastic organization seen in other metazoan phyla (the Eumetazoa). We identified a T-box gene from *Oscarella lobularis* named *OlTbx*. Remarkably, the *OlTbx* gene is specifically expressed in the prosopinacoderm forming inhalant channels of the aquiferous system. This expression pattern, the first one in sponges to be published, is reminiscent of *Tbx* expression in inner eumetazoan layers during gastrulation, suggesting that layer specification is an ancient function of the Tbx family. In addition to previous results for *Oscarella lobularis*, the T-box class of transcription factors is thought to be part of an ancient toolkit for epithelial patterning and morphogenesis in the animal kingdom.

**Key words**: T-box, *Tbx*, Homoscleromorpha, *Oscarella lobularis*, sponges, morphogenesis, germ layers, gastrulation.

## INTRODUCTION

The earliest steps in animal evolution remain obscure, but can be illuminated by comparative studies between the most basally branching animal groups, notably sponges, cnidarians and ctenophores. The sponges are widely accepted as one of the oldest metazoan lineages, with the choanoflagellates forming the sister group to Metazoa as a whole (Steenkamp et al. 2006; Nielsen 2008; Ruiz-Trillo et al. 2008; Philippe et al. 2009). On the basis of similarities between sponge choanocytes and choanoflagellates (collar cells), it was hypothesized that the acquisition of multicellularity occurred from a choanoflagellate-like ancestor. Early metazoans are then assumed to have comprised an epithelial-type cell layer bordering feeding (collar cells) and non-feeding cells (Nielsen 2008).

The emergence of multilayered animals through the formation of epithelia and germ layers is one of the most important design innovations in the evolution of metazoan body plans, indeed their spatial organization is linked to the specification of cell functions. Among the four sponge lineages - Hexactinellida, Calcispongia, Demospongiae and Homoscleromorpha -(Borchiellini et al. 2004; Philippe et al. 2009; Sperling et al. 2009) the latter are a key group for understanding this important event in early animal evolution (Nielsen 2008; Ereskovsky et al. 2009). The Homoscleromorpha are the only sponge group to possess eumetazoan-like true epithelia, characterized by the presence of type IV collagen and regularly distributed zonula adhaerens cell junctions both in larval and in adult forms (Boute et al. 1996; Boury-Esnault et al. 2003; Ereskovsky et al. 2007, 2009). As in the Eumetazoa, the presence of basement membrane and firm cell-adhesion junctions renders motility difficult and imposes epithelialtypes for morphogenesis and for stem cell systems. The formation of the adult layers in Homoscleromorpha occurs at metamorphosis and throughout the adult lifespan by the invagination of the outer layer of flagellated cells, the exopinacoderm, to form the inner layer, the endopinacoderm (Ereskovsky et al. 2007; Lapébie et al. 2009). As reviewed by Coutinho and de Azevedo Maia (2007), other sponges have adhesion structures "not so different from what is observed in colonial amoeba *Dictyostelium* " and a single totipotent stem cell system based on mesenchymal cell named archaeocytes. Thus, despite their multicellularity, adult organization of sponges "should be understood in cellular terms and not in terms of germ layers (...) except for the Homoscleromorpha» due to their true epithelium (Coutinho and de Azevedo Maia 2007).

Investigating genes involved in germ layer formation in the homoscleromorph model O.

lobularis (Ereskovsky et al. 2009) is expected to provide clues about ancestral genetic systems. In non-bilaterians, researches have so far focused on the Wnt pathway and the T-box gene Brachyury because they are most significant for understanding the origin of early embryonic patterning and gastrulation (Scholz and Technau 2003; Technau and Scholz 2003; Wikramanayake et al. 2003; Kusserow et al. 2005; Martindale 2005; Manuel 2009). Notably, T-Box genes act as important regulators of cell fate decisions that early establish body plan in Bilateria, but are also involved in later processes underlying organogenesis (Showell et al. 2004; Grapin-Botton and Constam 2007; Wardle and Papaioannou 2008). T-box genes are classified into five subfamilies and eight groups: Brachyury, Tbx1 (including Tbx1/10, Tbx15/18/22 and Tbx20 groups), Tbx2 (including Tbx2/3 and Tbx4/5 groups), Tbx6/VegT and Eomes/Tbr1/Tbx21 (Papaioannou 2001; Takatori et al. 2004). At least six of these groups would appear to have been present before the divergence between cnidarians and bilaterians (Yamada et al. 2007). The characterization of several T-box genes in the recently sequenced genome of the démosponge Amphimedon queenslandica, together with data previously available in other sponge species (Manuel et al. 2004; Adell and Müller 2005; Larroux et al. 2006; Larroux et al. 2008) suggest that at least three T-box genes were already present in the last common ancestor of Metazoa: a Brachyury, a Tbx4/5 and a Tbx1/15/20. This suggests great diversification after the sponge lineage divergence. Nevertheless, as evidence for gene losses specific to A. queenslandica was previously reported (Larroux et al. 2008), we may alternatively suspect a more extended set of T-Box genes in the Urmetazoa subsequently followed by loss events in one or several poriferan clades. Thus, additional data on other sponge models are needed to provide a basis for proposing valid evolutionary scenarios for the emergence and expansion of this gene family. Expression data of T-Box genes from basal metazoans (Martinelli and Spring 2003, 2005; Scholz and Technau 2003) are at present too scarce to warrant discussion of the ancestral role of T-Box family members (Martindale 2005; Yamada et al. 2007).

Here, we report the identification of a new *Tbx* and its specific expression in the inner layer of the homoscleromorph sponge *Oscarella lobularis*.

## **MATERIAL and METHODS**

#### **OlTbx** isolation

mRNA extraction and cDNA synthesis were carried out as previously described (Gazave et al. 2008). Degenerate primers pair (5'-GAATTCGGNMGNMGNATGTTYCC for GRRMFP amino-acids and 5'-GGATTRTTYTGRTANGCNGTNAC for VTAYQN amino-acids) specially designed for this study were used as follows. 40 PCR cycles were used on cDNA. They were composed by: denaturation at 94°C for 1 min, hybridization at 60°C for 1 min and extension for 2 min at 72°C. MgCl<sub>2</sub> concentration was 2mM, each primer was 0.4  $\mu$ M concentrated.

In order to get a sequence long enough to synthesize ISH probes, the fragment obtained was subsequently elongated by 3' RACE: the specific primer 5'-GCGTCGAGGTGAAGGAAATC with Not-I(dT)18(5'was paired Amplification was performed by 40 cycles composed by the following steps: 94°C for 1 min, 60°C for 1 min and extension for 2 min at 72°C. MgCl<sub>2</sub> concentration was 1 mM, specific primer was 1 µM concentrated while Not-I(dT)18 was 0.2 µM concentrated. Cloning and sequencing are detailed in (Gazave et al. 2008). The gene sequence is thus incomplete at the 5' end.

The 984bp sequence (partial at the 5' end) was, according to the results of this study, named *OlTbx* and is reported in Genbank: Accession number (GU045310).

## Alignment and phylogenetic analyses

Sequences were kindly provided by Larroux (Larroux et al. 2008). *AmqTbxA-E* sequences the positions of which were still unresolved after our analysis were finally removed while members of Tbx6 subfamilies from Yamada (2007) (*CiTbx6a, CiTbx6b, DrTbx6, MtTbx6, XlTbx6, XlVegT*) were added (Yamada et al. 2007). They were aligned by Muscle (<u>http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html</u>).

After a soft (see options in the website) treatment by GBlocks (<u>http://www.phylogeny.fr/phylo\_cgi/gblocks.cgi</u>), the resulting alignment comprised 63 TBXs proteins and 163 positions (available upon request).

Phylogenetic analyses were carried out by the maximum-likelihood (ML) method using the PhyML-2.4.4 program (Guindon and Gascuel 2003) and by Bayesian inference using the Mr Bayes-3.1.2 program (Huelsenbeck and Ronquist 2001). The WAG (Whelan and Goldman 2001) amino acid substitution model and a gamma distribution with four discrete categories were used.

For ML analysis, the gamma shape parameter and the proportion of invariant sites were optimized. Branch support was tested by bootstrapping (1000 replicates). For Bayesian analysis, six chains were run for 10,000,000 generations, one of which was heated; after a burn-in of 2,500,000 generations every 100th tree was sampled only after posterior likelihoods reached stationary values.

## In situ hybridizations

RNA probe (around 980pb) was synthesized with SP6/T7 DIG RNA Labelling Kit (Roche). *In situ* hybridizations were performed on both whole fixed lobes (WMHIS) and histological sections mounted on slides. They were carried out in a robot (InsituPro, Intavis AG) with a protocol previously described (Lapébie et al. 2009).

## **RESULTS and DISCUSSION**

#### Phylogenetic position of *OlTbx*

The sequence we isolated from *O. lobularis* by a PCR approach corresponds to a gene containing the complete coding sequence of a T-box domain. An alignment of Tbx sequences from several bilaterians as well as of a ctenophore *Mnemiopsis leidyi* (Yamada et al. 2007) and sponges was adapted from a recently published analysis (Larroux et al. 2008).

The topologies obtained with ML method or with Bayesian inference are overall congruent with recent published results (Yamada et al. 2007; Larroux et al. 2008). We recovered two well-defined clades, one formed by the two subfamilies Bra/Tbr and the other formed by the rest of the subfamilies (Tbx1, Tbx2 and Tbx6). Several sponge sequences from previous work (*AmqTbx4/5*, *SdTbx2*, *SdBra*, *SrBra*) included in our analyses are clearly affiliated with the Brachyury subfamily and *Tbx 4/5* group as previously observed (Larroux et al. 2008).

In our ML analysis, two other T-Box genes previously identified from the démosponges *Amphimedon queenslandica* and *Axinella verrucosa* (*AmqTbx1/15/20*, *AvTbx1/15/20*) together

with our newly obtained sequence from *O. lobularis* form a clade within the Tbx6 subfamily, with weak statistical support (Fig. 1B). To date, no genes related to Tbx6 members have been characterized outside the bilaterian lineage, leading authors to suggest that the diversification of the Tbx6 subfamily occurred in the bilaterian lineage (Yamada et al. 2007). It is important to note that even if many *Tbx* genes from basal metazoans have unresolved positions (Yamada et al. 2007; Larroux et al. 2008), we cannot exclude the possibility that some of them may represent very divergent members of the Tbx6 subfamily. In the Bayesian inference, our sequence stands in basal position at the well supported clade (maximal statistical value) comprising Tbx1, Tbx2 and Tbx6 subfamilies (Fig. 1A). Therefore, the belonging of *OlTbx* to Tbx6 subfamily is uncertain. *DmDoc1-3*, considered as members of Tbx6 subfamily, have also unstable position in our topologies (Figure 1). In previous study, statistical values weakly support the relationship within the Tbx6 subfamily (Yamada et al. 2007).

Although no clear orthology link within this group can be established, our results confirm that gene duplication events occurred before the radiation of sponges and that the metazoan ancestor genome would have contained at least three Tbx genes. But, according to the position of sponge sequences, while we agree with previous hypothesis proposing that one *Brachyury* and one *Tbx 4/5* were probably present in metazoan common ancestor (Larroux et al. 2008), the assignation of the supposed thirdl gene remains to be clarified.

#### OlTbx is a marker of the Oscarella lobularis's prosopinacoderm

By performing *in situ* hybridization on fixed pieces and serial sections of the adult stage of *O. lobularis*, we observed that *OlTbx* is exclusively expressed in epithelium bordering inhalant channels of the aquiferous system, named prosopinacoderm (Fig. 2). Such cell-type specific gene expression has already been reported in sponges (Richelle-Maurer and Van de Vyver 1999; Funayama et al. 2005; Gazave et al. 2008; Larroux et al. 2008; Lapébie et al. 2009). In sponges (Rasmont 1975; Simpson 1984; Pavans de Ceccatty 1986), morphogenetic processes are not restricted to embryonic development but act throughout the adult lifespan so that genes implicated in cell identity and body patterning may be expected to keep on expressing at the adult stage as in Cnidaria (Meinhardt 2002). Since adult structures require genes acting exclusively in bilaterian embryogenesis, the comparison of *Tbx* genes involvement in the prosopinacoderm of *O. lobularis* and in bilaterian endomesoderm developments is not far-fetched.

Prosopinacoderm in O. lobularis forms by invagination controlled by canonical WNT pathway (Lapébie et al., 2009) which is reminiscent with endomesoderm formation in eumetazoan gastrulas (Martindale and Hejnol, 2009). Although they exhibit diverse patterns of spatial and temporal expression during the embryogenesis and the organogenesis (Showell et al. 2004; Grapin-Botton and Constam 2007; Wardle and Papaioannou 2008), Tbx are implicated in germ layer specification and/or morphogenetic events during eumetazoan gastrulation (Technau 2001; Scholz and Technau 2003; Martindale 2005). This inner layer specification does not seem to be attributable to particular orthology group but would be an ancient feature of T-box domain containing genes. The Brachyury gene has been intensively studied in this field, because it was thought to be at the origin of the mesoderm (Technau and Scholz 2003; Showell et al. 2004; Naiche et al. 2005; Wardle and Papaioannou 2008). However, the comparison of its expression pattern between basal deuterostomes, protostomes, cnidarians and ctenophore embryos, seems to indicate that Brachyury ancestrally acts in gastrulation rather in morphogenetic processes (Martindale 2005; Bielen et al. 2007; Yamada et al. 2007) than in germ layer specification. Tbx6 subfamily is a mesodermal inducer in Vertebrates (Wardle and Papaioannou 2008) and is expressed in the ascidia Ciona presumptive mesoderm (Christiaen et al. 2009). Tbx6/Doc genes in Drosophila are expressed in the dorsal region of the blastoderm before gastrulation and are also required in the invagination of the epithelial layer, the amnioserosa, during gastrulation (Hamaguchi et al. 2004). VegT, a member of Tbx6 subfamily is maternally expressed during Xenopus laevis endomesoderm formation and is essential for specification of endoderm and the induction of mesoderm (Zhang et al. 1998; Xanthos et al. 2001; Clements and Woodland 2003; Grapin-Botton and Constam 2007). However orthologs of *VegT* are not implicated in endomesoderm in lamprey, ascidian, amphioxus, zebrafish and mouse because they are not expressed maternally, while *eomesodermin* orthologs are (Horton and Gibson-Brown 2002; Bruce et al. 2003; Takatori et al. 2004; Bruce et al. 2005; McConnell et al. 2005). Eomes, closely related to Brachyury (Fig. 1), is essential for meso-endoderm differentiation in all vertebrates from the lamprey and bichir (Bjornson et al. 2005; Grapin-Botton and Constam 2007; Takeuchi et al. 2009). In contrast, Eomes is not expressed maternally in X. laevis and is required for mesoderm induction, but not for endoderm specification (Ryan et al. 1996; Showell et al. 2004). Thus, it is assumed that VegT, as a maternal factor, has been co-opted to endomesoderm development secondarily in Amphibians (Takeuchi et al. 2009).

Since Tbx genes are expressed during gastrulation, the lack of functional data means that we are unable to determine their precise role either in germ layer specification or in

morphogenetic movements. However, in this work, the fact that OlTbx is specifically expressed in *O. lobularis*'s endopinacoderm in a constitutive manner, without morphogenetic events, suggests that the layer determination may be a function of this T-box containing gene.

# Perspectives: Are the WNT canonical pathway and T-box genes an ancient toolkit for epithelial morphogenesis and layer formation?

The *OlTbx* expression pattern we have described here, when compared to previous studies on the sponge *O. lobularis* and other basal eumetazoans, highlights striking mechanistic similarities for inner layer formation.

In Cnidaria and Homoscleromorpha, the inner layer is formed by invagination: prosopinaoderm of O. lobularis during ostium formation (Lapébie et al. 2009) and endoderm of Nematostella and Clytia during gastrulation (Byrum 2001; Kraus and Technau 2006). In O. lobularis, at least one Wnt gene is expressed in the external tip of prosopinacoderm at the frontier between the two layers (exo- and endopinacoderm) around the ostia (Lapébie et al. 2009). In the oral organizer of Cnidaria, Wnts are also expressed from blastopore to its derivate, the hypostome (Wikramanayake et al. 2003; Broun et al. 2005; Kusserow et al. 2005; Momose et al. 2008; Lengfeld et al. 2009). Both morphogenesis are initiated by WNT/βcatenin (Wikramanayake et al. 2003; Momose and Houliston 2007; Momose et al. 2008; Lapébie et al. 2009) and the noncanonical WNT pathway PCP (Momose and Houliston 2007; Momose et al. 2008; Lapébie, unpublished). The T-box gene Brachyury is expressed around the blastopore and endodermal mesenteries in Nematostella (Scholz and Technau 2003) and in the endoderm of the mouth anlage in Hydra (Technau and Bode 1999; Spring et al. 2002) as well as in Ctenophora (Yamada et al. 2007)) and seems to be transcriptionally controlled by WNT canonical pathway (Broun et al. 2005). As described before, T-box gene from O. lobularis, OlTbx has a comparable expression pattern compatible with prosopinacoderm specification.

Since *OlTbx* is not orthologous of *Brachyury*, its expression pattern cannot be taken as an evidence for homology between both structures. However, evidences in vertebrate embryology indicate that the endomesoderm specification function is not necessarily correlated with any group of orthology. Indeed, co-optation of *VegT* in endomesoderm specification instead of *Eomes* have been reported in amphibians. *Brachyury* was co-opted in notochord

induction in chordates. Therefore, this gene swapping within various *Tbx* clades suggest that inner layer specification would be an ancient feature of T-box in Metazoa.

This finding merits further testing because it may shed light on a conserved use of the molecular toolkit «WNT signaling/T-box transcription factors» in fundamental morphogenetic and differentiation processes. Any parallels between expression in both invaginating epithelial layers may result from evolutive convergence, favored by highly conserved functions of both WNT signaling and T-box domains at molecular and cellular levels. More genetic data and functional evidence on different stage like metamorphosis will be needed to test appealing hypotheses of homology of structure between Homoscleromorpha and Eumetazoa as recently proposed (Maldonado 2004; Nielsen 2008; Mikhailov et al. 2009) but still unverified.

## CONCLUSION

The characterization of new *Tbx* gene in a homoscleromorph sponge species, *Oscarella lobularis* and the phylogenetic analyses of T-Box sequences confirms that the Urmetazoa probably owned three *Tbx* genes but challenges the assignation of one of this ancestral genes. The expression pattern of this gene, *OlTbx*, is restricted to the invaginating epithelial layer named prosopinacoderm in *O. lobularis*. Although this study does not allow definitive conclusions concerning either the evolution of the T-box family or their ancestral role, it suggests that the ancestral role of T-box contining genes may have concerned cell layer formation and raises challenging questions regarding a potentially conserved WNT/T-box system regulating epithelial formation. Further studies are needed and, with regard to their epithelial development and organization, the Homoscleromorpha appear to be a suitable sponge group for this purpose.

## Acknowledgments

We specially thank Dr. Claire Larroux (University of Queensland, Australia) and Dr. Atsuko Yamada (Hokkaido University, Japan) for making available their alignments. We are grateful to Dr. Jean Vacelet and Dr. Nicole Boury-Esnault (Marseilles) for giving us the benefit of their extensive knowledge of sponges. We thank also the Diving staff of the Centre d'Océanologie de Marseille. This work was partly financially supported by the grant of RFBR (grants no. 09-04-00337) and by the grant Marie Curie IIF MIF1-CT-2006-040065 PHENOMED.

#### **Figure legends**

#### Figure 1

Inference tree of the T-box gene families. A. Bayesian tree. B. Maximum likelihood tree. Bayesian posterior probabilities (A) and bootstrap values for 100 replicates (B) are statistical supports of nodes. Sponge branches are marked by asterisks. Taxon abbreviations: Amq: Amphimedon queenslandica, démosponge; Ap: Asterina pectinifera, echinoderm; Av: Axinella verrucosa, démosponge; Ci: Ciona intestinalis, urochordate; Dm: Drosophila melanogaster, insect; Dr: Danio rerio, vertebrate; He: Hydractinia echinata, hydrozoan cnidarian; Lg: Lottia gigantea, mollusk; Lv: Lytechinus variegatus, echinoderm; Mm: Mus musculus, vertebrate; Mt: Molgula tectiformis, ascidian; Nv: Nematostella vectensis, anthozoan cnidarian; Ol: Oscarella lobularis, Homoscleromorpha, sponge; Om: Oopsacas minuta, hexactinellid sponge; Pc: Podocoryne carnea, hydrozoan cnidarian; Pf: Ptychodera flava, hemichordate; Pp: Pleurobrachia pileus, ctenophore; Pv: Patella vulgata vulgaris, mollusk; Sd: Suberites domuncula, démosponge; Sr: Sycon raphanus, calcarae, sponge; Ta: Trichoplax adhaerens, placozoan; XI: Le Xenopus laevis, vertebrate

### Figure 2

Expression pattern of *OlTbx* in *Oscarella lobularis* prosopinacoderm in adult tissues. (A, B): *In situ* hybridization on serial histological sections (A) and whole mount sponge pieces (B) with digoxygenin RNA probes for *OlTbx*. Inhalant channels of the aquiferous system (prosopinacoderm) express *OlTbx*. (C, D) Scanning electron microscopy magnification of the body of *O. lobularis* (C) and drawing from Schulze (1877) explaining anatomical structures of *O. lobularis* (D). Ch. C: Choanocyte chamber. Ex: Exopinacoderm. In. cn.: principal inhalant. Ex. cn.: exhalant channels of the aquiferous system.

## References

Adell, T. and Müller, W. E. 2005. Expression pattern of the *Brachyury* and *Tbx2* homologues from the sponge *Suberites domuncula*. *Biol. Cell.* 97 (8):641-50.

Bielen, H., Oberleitner, S., Marcellini, S., Gee, L., Lemaire, P., Bode, H. R., Rupp, R., and Technau, U. 2007. Divergent functions of two ancient *Hydra Brachyury* paralogues suggest specific roles for their C-terminal domains in tissue fate induction. *Development* 134 (23):4187-97.

Bjornson, C. R., Griffin, K. J., Farr, G. H., 3rd, Terashima, A., Himeda, C., Kikuchi, Y., and Kimelman, D. 2005. *Eomesodermin* is a localized maternal determinant required for endoderm induction in zebrafish. *Dev. Cell* 9 (4):523-33.

Borchiellini, C., Chombard, C., Manuel, M., Alivon, E., Vacelet, J., and Boury-Esnault, N. 2004. Molecular phylogeny of Demospongiae: implications for classification and scenarios of character evolution. *Mol Phylogenet Evol* 32 (3):823-37.

Boury-Esnault, N., Ereskovsky, A. V., Bezac, C., and Tokina, D. B. 2003. Larval development in the Homoscleromorpha (Porifera, Demospongiae). *Invertebr. Biol.* 122 (3):187-202.

Boute, N., Exposito, J. Y., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Noro, N., Miyazaki, K., Yoshizato, K., and Garrone, R. 1996. Type IV collagen in sponges, the missing link in basement membrane ubiquity. *Biol Cell* 88 (1-2):37-44.

Broun, M., Gee, L., Reinhardt, B., and Bode, H. R. 2005. Formation of the head organizer in *Hydra* involves the canonical Wnt pathway. *Development* 132 (12):2907-16.

Bruce, A. E., Howley, C., Dixon Fox, M., and Ho, R. K. 2005. T-box gene *eomesodermin* and the homeobox-containing *Mix/Bix* gene *mtx2* regulate epiboly movements in the zebrafish. *Dev. Dyn.* 233 (1):105-14.

Bruce, A. E., Howley, C., Zhou, Y., Vickers, S. L., Silver, L. M., King, M. L., and Ho, R. K. 2003. The maternally expressed zebrafish T-box gene *eomesodermin* regulates organizer formation. *Development* 130 (22):5503-17.

Byrum, C. A. 2001. An analysis of hydrozoan gastrulation by unipolar ingression. *Dev. Biol.* 240 (2):627-40.

Clements, D. and Woodland, H. R. 2003. *VegT* induces endoderm by a self-limiting mechanism and by changing the competence of cells to respond to TGF-beta signals. *Dev Biol* 258 (2):454-63.

Coutinho, C. C. and de Azevedo Maia, G. 2007. Mesenchymal cells in ancestral spongiomorph urmetazoa could be the mesodermal precursor before gastrulation origin. *In:* 

Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. G. L.-H. M.R. Custódio, E. Hajdu, G. Muricy. Rio de Janeiro, Museu Nacional. 28:281-295.

Ereskovsky, A. V., Borchiellini, C., Gazave, E., Ivanisevic, J., Lapébie, P., Perez, T., Renard, E., and Vacelet, J. 2009. The Homoscleromorph sponge *Oscarella lobularis*, a promising sponge model in evolutionary and developmental biology. *Bioessays* 31 (1):89-97.

Ereskovsky, A. V., Tokina, D. B., Bezac, C., and Boury-Esnault, N. 2007. Metamorphosis of cinctoblastula larvae (Homoscleromorpha, Porifera). *J. Morphol.* 268 (6):518-28.

Funayama, N., Nakatsukasa, M., Hayashi, T., and Agata, K. 2005. Isolation of the choanocyte in the fresh water sponge, *Ephydatia fluviatilis* and its lineage marker, *Ef annexin. Dev. Growth Differ.* 47 (4):243-53.

Gazave, E., Lapebie, P., Renard, E., Bezac, C., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Perez, T., Manuel, M., and Borchiellini, C. 2008. *NK* homeobox genes with choanocyte-specific expression in homoscleromorph sponges. *Dev. Genes Evol.* 218 (9):479-89.

Grapin-Botton, A. and Constam, D. 2007. Evolution of the mechanisms and molecular control of endoderm formation. *Mech. Dev.* 124 (4):253-78.

Guindon, S. and Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52 (5):696-704.

Hamaguchi, T., Yabe, S., Uchiyama, H., and Murakami, R. 2004. *Drosophila Tbx6*-related gene, *Dorsocross*, mediates high levels of Dpp and Scw signal required for the development of amnioserosa and wing disc primordium. *Dev. Biol.* 265 (2):355-68.

Horton, A. C. and Gibson-Brown, J. J. 2002. Evolution of developmental functions by the *Eomesodermin, T-brain-1, Tbx21* subfamily of T-box genes: insights from amphioxus. *J. Exp. Zool.* 294 (2):112-21.

Huelsenbeck, J. P. and Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17 (8):754-5.

Kraus, Y. and Technau, U. 2006. Gastrulation in the sea anemone *Nematostella vectensis* occurs by invagination and immigration: an ultrastructural study. *Dev. Genes Evol.* 216 (3):119-32.

Kusserow, A., Pang, K., Sturm, C., Hrouda, M., Lentfer, J., Schmidt, H. A., Technau, U., von Haeseler, A., Hobmayer, B., Martindale, M. Q., and Holstein, T. W. 2005. Unexpected complexity of the *Wn*t gene family in a sea anemone. *Nature* 433 (7022):156-60.

Lapébie, P., Gazave, E., Ereskovsky, A. V., Derelle, R., Bezac, C., Renard, E., Houliston, E., and Borchiellini, C. 2009. WNT/beta-catenin signalling and epithelial patterning in the homoscleromorph sponge *Oscarella*. *PLoS One* 4 (6):e5823.

Larroux, C., Fahey, B., Liubicich, D., Hinman, V. F., Gauthier, M., Gongora, M., Green, K., Worheide, G., Leys, S. P., and Degnan, B. M. 2006. Developmental expression of transcription factor genes in a demosponge: insights into the origin of metazoan multicellularity. *Evol. Dev.* 8 (2):150-73.

Larroux, C., Luke, G. N., Koopman, P., Rokhsar, D. S., Shimeld, S. M., and Degnan, B. M. 2008. Genesis and expansion of metazoan transcription factor gene classes. *Mol. Biol. Evol.* 25 (5):980-96.

Lengfeld, T., Watanabe, H., Simakov, O., Lindgens, D., Gee, L., Law, L., Schmidt, H. A., Ozbek, S., Bode, H., and Holstein, T. W. 2009. Multiple *Wnts* are involved in *Hydra* organizer formation and regeneration. *Dev. Biol.* 330 (1):186-99.

Maldonado, M. 2004. Choanoflagellates, choanocytes, and animal multicellularity. *Invertebr. Biol.* 123 (1):1-22.

Manuel, M. 2009. Early evolution of symmetry and polarity in metazoan body plans. *C. R. Biol.* 332 (2-3):184-209.

Manuel, M., Le Parco, Y., and Borchiellini, C. 2004. Comparative analysis of *Brachyury* T-domains, with the characterization of two new sponge sequences, from a hexactinellid and a calcisponge. *Gene* 340 (2):291-301.

Martindale, M. Q. 2005. The evolution of metazoan axial properties. *Nat. Rev. Genet.* 6 (12):917-27.

Martinelli, C. and Spring, J. 2003. Distinct expression patterns of the two T-box homologues *Brachyury* and *Tbx2/3* in the placozoan *Trichoplax adhaerens*. *Dev. Genes Evol.* 213 (10):492-9.

Martinelli, C. and Spring, J. 2005. T-box and homeobox genes from the ctenophore *Pleurobrachia pileus*: comparison of *Brachyury, Tbx2/3* and *Tlx* in basal metazoans and bilaterians. *FEBS Lett.* 579 (22):5024-8.

McConnell, J., Petrie, L., Stennard, F., Ryan, K., and Nichols, J. 2005. *Eomesodermin* is expressed in mouse oocytes and pre-implantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 71 (4):399-404.

Meinhardt, H. 2002. The radial-symmetric *Hydra* and the evolution of the bilateral body plan: an old body became a young brain. *Bioessays* 24 (2):185-91.

Mikhailov, K. V., Konstantinova, A. V., Nikitin, M. A., Troshin, P. V., Rusin, L. Y., Lyubetsky, V. A., Panchin, Y. V., Mylnikov, A. P., Moroz, L. L., Kumar, S., and Aleoshin, V. V. 2009. The origin of Metazoa: a transition from temporal to spatial cell differentiation. *Bioessays* 31 (7):758-68. Momose, T., Derelle, R., and Houliston, E. 2008. A maternally localised Wnt ligand required for axial patterning in the cnidarian *Clytia hemisphaerica*. *Development* 135 (12):2105-13.

Momose, T. and Houliston, E. 2007. Two oppositely localised frizzled RNAs as axis determinants in a cnidarian embryo. *PLoS Biol* 5 (4):e70.

Naiche, L. A., Harrelson, Z., Kelly, R. G., and Papaioannou, V. E. 2005. T-box genes in vertebrate development. *Annu Rev Genet* 39:219-39.

Nielsen, C. 2008. Six major steps in animal evolution: are we derived sponge larvae? *Evol. Dev.* 10 (2):241-57.

Papaioannou, V. E. 2001. T-box genes in development: from hydra to humans. *Int. Rev. Cytol.* 207:1-70.

Pavans de Ceccatty, M. P. 1986. Cytoskeletal organization and tissue patterns of epithelia in the sponge *Ephydatia muelleri*. *J. Morphol.* 189 (45-65).

Philippe, H., Derelle, R., Lopez, P., Pick, K., Borchiellini, C., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Renard, E., Houliston, E., Queinnec, E., Da Silva, C., Wincker, P., Le Guyader, H., Leys, S., Jackson, D. J., Schreiber, F., Erpenbeck, D., Morgenstern, B., Worheide, G., and Manuel, M. 2009. Phylogenomics Revives Traditional Views on Deep Animal Relationships. *Curr. Biol.* 19 (8):706-712.

Rasmont, R. 1975. Freshwater sponges as a material for the study of cell differentiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 10:141-59.

Richelle-Maurer, E. and Van de Vyver, G. 1999. Temporal and spatial expression of *EmH-3*, a homeobox-containing gene isolated from the freshwater sponge *Ephydatia muelleri*. *Mech. Ageing Dev.* 109 (3):203-19.

Ruiz-Trillo, I., Roger, A. J., Burger, G., Gray, M. W., and Lang, B. F. 2008. A phylogenomic investigation into the origin of Metazoa. *Mol. Biol. Evol.* 25 (4):664-72.

Ryan, K., Garrett, N., Mitchell, A., and Gurdon, J. B. 1996. *Eomesodermin*, a key early gene in *Xenopus* mesoderm differentiation. *Cell* 87 (6):989-1000.

Scholz, C. B. and Technau, U. 2003. The ancestral role of *Brachyury*: expression of *NemBra1* in the basal cnidarian *Nematostella vectensis* (Anthozoa). *Dev. Genes Evol.* 212 (12):563-70.

Scholz, C. B. and Technau, U. 2003. The ancestral role of *Brachyury*: expression of *NemBra1* in the basal cnidarian *Nematostella vectensis* (Anthozoa). *Dev Genes Evol* 212 (12):563-70.

Schulze, F. E. 1877. Untersuchungen Über den Bau und die Entwicklung der Spongien. Die Gattung Halisarca. Z. Wiss. Zool. Abt. A 28:1-48.

Showell, C., Binder, O., and Conlon, F. L. 2004. T-box genes in early embryogenesis. *Dev. Dyn.* 229 (1):201-18.

Simpson, T. R. 1984. The cell biology of sponges. Edited by Springer: Verlag New York.

Sperling, E. A., Peterson, K. J., and Pisani, D. 2009. Phylogenetic-signal dissection of nuclear housekeeping genes supports the paraphyly of sponges and the monophyly of Eumetazoa. *Mol. Biol. Evol.* 26 (10):2261-74.

Spring, J., Yanze, N., Josch, C., Middel, A. M., Winninger, B., and 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 (2):372-84.

Steenkamp, E. T., Wright, J., and Baldauf, S. L. 2006. The protistan origins of animals and fungi. *Mol. Biol. Evol.* 23 (1):93-106.

Takatori, N., Hotta, K., Mochizuki, Y., Satoh, G., Mitani, Y., Satoh, N., Satou, Y., and Takahashi, H. 2004. T-box genes in the ascidian *Ciona intestinalis*: characterization of cDNAs and spatial expression. *Dev. Dyn.* 230 (4):743-53.

Takeuchi, M., Takahashi, M., Okabe, M., and Aizawa, S. 2009. Germ layer patterning in bichir and lamprey; an insight into its evolution in vertebrates. *Dev. Biol.* 332 (1):90-102.

Technau, U. 2001. *Brachyury*, the blastopore and the evolution of the mesoderm. *Bioessays* 23 (9):788-94.

Technau, U. and Bode, H. R. 1999. *HyBra1*, a *Brachyury* homologue, acts during head formation in *Hydra*. *Development* 126 (5):999-1010.

Technau, U. and Scholz, C. B. 2003. Origin and evolution of endoderm and mesoderm. *Int. J. Dev. Biol.* 47 (7-8):531-9.

Wardle, F. C. and Papaioannou, V. E. 2008. Teasing out T-box targets in early mesoderm. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18 (5):418-25.

Whelan, S. and Goldman, N. 2001. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.* 18 (5):691-9.

Wikramanayake, A. H., Hong, M., Lee, P. N., Pang, K., Byrum, C. A., Bince, J. M., Xu, R., and Martindale, M. Q. 2003. An ancient role for nuclear beta-catenin in the evolution of axial polarity and germ layer segregation. *Nature* 426 (6965):446-50.

Xanthos, J. B., Kofron, M., Wylie, C., and Heasman, J. 2001. Maternal *VegT* is the initiator of a molecular network specifying endoderm in *Xenopus laevis*. *Development* 128 (2):167-80.

Yamada, A., Pang, K., Martindale, M. Q., and Tochinai, S. 2007. Surprisingly complex T-box gene complement in diploblastic metazoans. *Evol. Dev.* 9 (3):220-30.
Zhang, J., Houston, D. W., King, M. L., Payne, C., Wylie, C., and Heasman, J. 1998. The role of maternal *VegT* in establishing the primary germ layers in *Xenopus* embryos. *Cell* 94 (4):515-24.





### Figure 2

#### Figure 2



## ANNEXE III

## Article 9: WNT/β-Catenin Signalling and Epithelial Patterning in the Homoscleromorph Sponge Oscarella

Ce travail dont je suis 2<sup>e</sup> auteur a fait l'objet d'un article de recherche publié dans la revue Plos One en 2009

# WNT/β-Catenin Signalling and Epithelial Patterning in the Homoscleromorph Sponge *Oscarella*

## Pascal Lapébie<sup>1</sup>\*, Eve Gazave<sup>1</sup>, Alexander Ereskovsky<sup>1,2</sup>, Romain Derelle<sup>3</sup>, Chantal Bézac<sup>4</sup>, Emmanuelle Renard<sup>1</sup>, Evelyn Houliston<sup>3</sup>, Carole Borchiellini<sup>1</sup>

1 Centre d'Océanologie de Marseille, Aix-Marseille Université, CNRS - UMR 6540, Station marine d'Endoume, Marseille, France, 2 Faculty of Biology and Soils, Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia, 3 Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, CNRS UMR 7009 Biologie du Développement, Observatoire Océanologique, Villefranche-sur-Mer, France, 4 Centre d'Océanologie de Marseille, Aix-Marseille Université, CNRS–UMS 2196, Station marine d'Endoume, Marseille, France

#### Abstract

Sponges branch basally in the metazoan phylogenetic tree and are thus well positioned to provide insights into the evolution of mechanisms controlling animal development, likely to remain active in adult sponges. Of the four sponge clades, the Homoscleromorpha are of particular interest as they alone show the "true" epithelial organization seen in other metazoan phyla (the Eumetazoa). We have examined the deployment in sponges of Wnt signalling pathway components, since this pathway is an important regulator of many developmental patterning processes. We identified a reduced repertoire of three divergent *Wnt* ligand genes in the recently-sequenced *Amphimedon queenslandica* (demosponge) genome and two *Wnts* from our EST collection from the homoscleromorph *Oscarella lobularis*, along with well-conserved genes for intracellular pathway components ( $\beta$ -catenin, GSK3 $\beta$ ). Remarkably, the two *O. lobularis Wnt* genes showed complementary expression patterns in relation to the evenly spaced ostia (canal openings) of the exopinacoderm (ectoderm), highly reminiscent of *Wnt* expression during skin appendage formation in vertebrates. Furthermore, experimental activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway using GSK3 $\beta$  inhibitors provoked formation of ectopic ostia, as has been shown for epithelial appendages in Eumetazoa. We thus suggest that deployment of Wnt signalling is a common and perhaps ancient feature of metazoan epithelial patterning and morphogenesis.

Citation: Lapébie P, Gazave E, Ereskovsky A, Derelle R, Bézac C, et al. (2009) WNT/β-Catenin Signalling and Epithelial Patterning in the Homoscleromorph Sponge Oscarella. PLoS ONE 4(6): e5823. doi:10.1371/journal.pone.0005823

Editor: Vincent Laudet, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France

Received December 27, 2008; Accepted May 4, 2009; Published June 8, 2009

**Copyright:** © 2009 Lapébie et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: CNRS-Université de la Méditerranée. This work was partly supported by program RFBR No 09-04-00337 and European Marie Curie Mobility program (fellowship of A. Ereskovsky, MIF1-CT-2006-040065). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: pascal.lapebie@univmed.fr

#### Introduction

The earliest steps in animal evolution remain obscure, but can be illuminated by comparative studies between the most basally branching animal groups, notably sponges, cnidarians and ctenophores. The sponges are widely accepted as one of the oldest metazoan lineages, with the unicellular choanoflagellates forming a sister group to the metazoa as a whole [1,2,3,4]. Since sponge choanocytes and choanoflagellates show many similarities, the first step of animal evolution has been proposed to have been the acquisition of multicellularity from a choanoflagellate-like ancestor, with early metazoans comprising epithelial-type cell layer containing feeding choanocytes and non-feeding cells [1,5,6]. Such multicellular epithelia are considered as a fundamental metazoan innovation, enabling a range of morphogenetic processes and leading to body plan diversification [7].

Among the four sponge lineages -Hexactinellida, Calcispongiae, Demospongiae and Homoscleromorpha- [8,9] the homoscleromorphs are a key group for understanding the origin and evolution of epithelia [1,10]. The homoscleromorphs are the only sponge group to possess eumetazoan-like true epithelia, characterized by the presence of basement membrane with type IV collagen and regularly distributed *zonula adhaerens* cell junctions both in larval and in adult forms [11,12,13]. In addition, unlike other sponges, they show epithelial-type morphogenesis during development [14,15]. In this context, it is interesting to note that the Homoscleromorpha and the Eumetazoa share quasi equivalent molecular toolkits for two key aspects of epithelial function, cell adhesion and signalling [16]. A subset of molecules involved in both these functions has been identified in Choanoflagellates, and therefore predates multicellularity [17,18].

Among major signalling molecules, the WNTs are metazoan protein ligands that control diverse processes such as cell proliferation, cell-fate determination, cell migration and differentiation during multiple steps of embryonic development [19], as well as in tissue homeostasis in adults, regulating stem cell populations [20] in regenerating tissues including Hydra polyps and [21] vertebrate intestine [22]. The WNT family appears to have made an early apparition and diversification during animal evolution, since twelve of the thirteen known *Wnt* subfamilies have been identified in cnidarians [23] but none in the genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* [18].

WNT ligands can influence cell behaviour by activating a number of distinguishable downstream intracellular pathways [24]. The most intensively studied is the "canonical" or Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, in which WNT binding to Frizzled family receptors provokes stabilization and nuclear translocation of the transcriptional co-regulator  $\beta$ -catenin via inhibition of the

DLoS ONE | www.plosone.org

1

cytoplasmic kinase GSK-3 $\beta$  [19]. Components of this pathway have been identified in Demospongiae [25], with polarized expression of a *Wnt* gene in *Amphimedon queenslandica* larva suggesting a role in embryo patterning [26].

Among the Homoscleromorpha, the existence of Wnt signalling components was noted previously in *Oscarella carmela* [16]. We now report complementary expressions of two *Wnts* in adult tissue of *Oscarella lobularis* [10]. By comparison with known epithelial *Wnt* expression patterns in Eumetazoa, the observed expression patterns indicate that canonical Wnt signalling is involved in epithelial patterning in these animals. This conclusion was supported by our pharmacological inhibition experiments, the first functional test of the role of Wnt signalling in a sponge. In the light of these findings we propose that Wnt signalling have a common and perhaps ancestral function in metazoans to regulate epithelial morphogenesis,

#### **Results and Discussion**

#### Low WNT complexity in basally diverging metazoan phyla

There has been no previous exhaustive survey of *Wnt* representation in sponge genomic data. We identified three *Wnt* sequences in the complete genome sequence of *Amphimedon queenslandica* (AqWNTT-III), as well as two from an Oscarella lobularis EST collection (OlWNTT-II). The *Wnt* gene repertoire in A. queenslandica is thus markedly less extensive than that of cnidarians and bilaterians, as it has been found for other developmental gene families [27]. All five predicted sponge WNT proteins showed typical structural characteristics, including a highly conserved cysteine pattern (alignment available upon request) and peptide secretion signals, but their sequences were highly divergent compared to a reference dataset comprising the complete WNT repertoire retrieved from selected deuterostome, protostome and cnidarian genomes. They could thus not be assigned orthology to any of the previously defined eumetazoan WNT sub-families (Figure 1), as has been the case for WNTs from fast-evolving bilaterian [28] and hydrozoan [23,29] species. Another indicator of the considerable evolutionary divergence of WNT sequences was the sensitivity of the relationships between WNT subfamilies to the method of analysis and to gene sampling. Given this marked divergence of Wnt sequences, more genomic data from different sponge clades and from other basally diverging metazoan phyla will be required to discriminate between the evolutionary scenarios of Wnt gene loss in one or more sponge groups from a larger set present in the last common ancestor of Metazoa, versus significant diversification of the family in the eumetazoan lineage post-dating the split between eumetazoans and sponges.

## Complementary *Wnt* expression patterns in the homoscleromorph exopinacoderm

Expression patterns of the two *Oscarella Wnt* genes, determined using fixed pieces and serial sections of adult sponges, revealed striking complementary expression domains in the outer epithelial



**Figure 1. Maximum likelihood inference tree of the WNT families.** Sponge branches are bold: OIWNT-I, -II (*Oscarella lobularis*) and AqWNT-I, -II and -III (*Amphimedon queenslandica*). AqWNT-II (asterisk) corresponds to the published Amphimedon sequence [26]. Bootstrap support values and Bayesian posterior probabilities are available in the Supplementary file S1. doi:10.1371/journal.pone.0005823.g001

DLoS ONE | www.plosone.org

2



**Figure 2. Complementary expression patterns of** *Wnt* **ligands in** *Oscarella lobularis* **exopinacoderm.** *In situ* hybridization on serial histological sections (A.1) and whole mount sponge pieces (A.2–3, B.1–2) with digoxygenin RNA probes for *OlWnt-I* (A.1–3) and *OlWnt-II* (B.1–2). A.1–3: *OlWnt-I* mRNA expression localizes exclusively to the inter-ostial exopinacoderm. B: *OlWnt-II* signal is specifically elevated in ostia. (B.2) Higher-magnification view of an ostium and inhalant channel. (B.1, A.3). Ch. C: Choanocyte chamber. Ex: Exopinacoderm. In. C:Inhalant channel. O: Ostium. Positive and negative controls for these techniques under the same conditions have been performed and gived same results as previously on both whole mounted and sectioned material [5]. doi:10.1371/journal.pone.0005823.g002

cell layer, the exopinacoderm (Figure 2). OlWntII expression (Figure 2B1-B2) was detected exclusively in entry zones (ostia) of the inhalant channels, which are regularly spaced and formed by epithelial invagination of the exopinacoderm (Figure 3E). Similar localized Wnt expression has been described during epithelial appendage formation in diverse eumetazoan species, including Hydra and Nematostella tentacles [23] and the Drosophila wing [30].

In contrast to OlWntII, OlWntI RNA was detected in the intervening regions of the exopinacoderm (Figure 2A1–A3). The complementary expression patterns of the two O. lobularis Wnts are thus strongly reminiscent of Wnt expression during the ectodermal morphogenesis in vertebrates. In vertebrates, specific WNT ligands (WNTs 10-b, 1, 3a,) activate the formation of spaced epithelial appendages such as hairs, mammary glands, taste papillae, teeth and feathers [31]. Distinct Wnts (Wnt11 for feathers [31], Wnt3 and Wnt7-b for teeth [32], Wnt4 and Wnt6 for hair [33]) are expressed in the inter–appendage epithelium. OlWntI expression in the inter–ostial exopinacoderm is clearly comparable with the inter-appendage Wnt expression in vertebrate skin, and OlWntII expression in ostia with Wnts expressed in developing skin appendages. We cannot rule out the possibility that the phenomena of complementary Wnt expression in epithelial layers

is more widespread, since the lack of similar descriptions protostomes, invertebrate deuterostomes other non-bliaterians may result from a general lack of attention to *Wnt* expression in adult epithelia.

The similarity of the complementary *Wnt* expression patterns in *Oscarella* and vertebrate epithelial appendages clearly should not be taken as evidence for homology of these structures, particularly given their late appearance during ontogeny and the phylogenetic distance between the groups. Thus any parallelism between *Wnt* expression in the exopinacoderm and eumetazoan epithelial layers such as skin probably results from evolutive convergence, favoured by the inherent patterning properties of WNT signalling systems.

## Activation of the $Wnt/\beta$ -catenin pathway promotes ectopic ostia formation

In vertebrate models it has been shown that the WNT ligands implicated in activating skin appendage formation via the canonical pathway [32,34,35,36,37,38], while inter-appendage expressed WNTs can activate non-canonical Wnt pathways (e.g. involving the kinase Jun) while inhibiting canonical signalling [31,39]. Activation of the canonical Wnt pathway by pharmacological or genetic approaches induces formation of a broad range of epithelial

D. PLoS ONE | www.plosone.org

3



**Figure 3. Stimulation of Wnt/β-catenin signalling promotes ostia formation.** A–C: Scanning electron microscope images of pieces of sponge cultured without treatment (A), treated for 72 h with 40 mM LiCl (B), or treated for 48 h with 0.5 µM BIO (C). Both LiCl-treated and BIO-treated samples have more ostia than controls. Ostia pre-existing before treatment are shown by arrows and ectopic ostia by asterisks. D–E: Semi-thin sections of untreated (D) and BIO-treated (E) sponge explants, showing changes in epithelium morphology. Note increased number and ovoid shape of epithelial cells in treated samples. Higher-magnification views of sequential sections of ectopic ostia forming by epithelial invagination from placode-like structures are shown on the right panels in E. Similar results were obtained with LiCl-treated sponges (data not shown). Ostia existing before treatment are shown by arrows and ectopic ostia are shown by asterisks. (Ch. C) Choanocyte chamber. (Ex) Exopinacodem. (Ex. C) Exhalant channel. (M) Mesohyl doi:10.1371/journal.pone.0005823.g003

appendages in vertebrates including hair follicles [37,40], fungiform taste papilla [32], mammary glands [34], tooth [32,41] and feathers [38], as well as tentacles in cnidarians [23,42,43]. To test the function of the canonical Wnt pathway in ostia formation in *Oscarella*, we thus activated it globally in cultured sponge pieces using two independent inhibitors of the negative regulator GSK3 $\beta$ : LiCl [44] and a newly-developed highly specific inhibitor called BIO [45]. We first confirmed that *O. lobularis* has conserved  $\beta$ -catenin and GSK3 $\beta$  genes, as in other sponges [16,25]. 2–3 day treatments with LiCl or BIO provoked the development of ectopic ostia across the exopinacoderm surface, positioned between existing ostia (Figure 3D–E). Reminiscent of vertebrate skin appendages, ectopic ostia were first detectable as placode-like structures prior to epithelial invagination (Figure 3D–E).

The phenotypes observed using the two inhibitors were very similar; however BIO gave stronger and more rapid effects, in line with its higher specific activity. Statistical analyses confirmed that the number of ostia in treated sponges was significantly higher than in control sponges (Figure 4). The inhibitors also provoked other changes in morphology as revealed by SEM (Figure 3A–C), not unexpected since Wnt signalling is not only involved in initiating appendage formation but also in subsequent steps of morphogenesis [46,47]. For example, similar changes in shape and size have been observed following lithium-treatment of taste papilla [36], mammary glands [34] and tooth [36] primordia.

Taken together our data indicate that canonical Wnt signalling has an early role in placode induction in *Oscarella* and probably in other aspects of ostia morphogenesis, as is the case in epithelial appendage morphogenesis in a variety of other species including cnidarians [43]. It thus appears clear that WNT/catenin and probably non-canonical Wnt signalling were involved in epithelial morphogenesis very early in animal evolution. Whether specific

PLoS ONE | www.plosone.org



Figure 4. Quantification of the number of ostia in control sponge explants (n=3) and in explants subjected to 48 h of 0.5  $\mu$ m BIO (n=3) or to 72 h (n=3) of 40 mM LiCl. Error bars represent s.e.m. T-Student tests show significant differences between mean numbers of ostia in treated and control samples, (P<0.001 for both mean comparisons to control: 33.8 $\pm$ 3.8 (mean $\pm$ s.d, n=5.) in the LiCl-treated samples, 61 $\pm$ 8.6 (n=3) in BIO-treated samples and 21.8 $\pm$ 2.5 (n=3) in control samples per 400 $\times$  field. Thirty fields were counted for each. doi:10.1371/journal.pone.0005823.g004

configurations of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling and *Wnt* expression in epithelial patterning and morphogenesis have been conserved since the divergence of Homoscleromorpha and Eumetazoa or have appeared convergently remains open to debate. In any case, it appears clear that these two metazoan lineages use components from a common molecular toolkit to pattern epithelia, as they do to maintain epithelial undifferentiated cells [20]. More generally, *Oscarella lobularis*, with its true epithelium (pinacoderm) and underlying mesenchyme (mesohyl), should prove valuable to help evaluate the participation of epithelial patterning systems in the differentiation of body compartments [48] during animal body plan evolution.

#### **Materials and Methods**

#### Sequence data

Wnt sequences from Oscarella lobularis and Amphimedon queenslandica were identified by tBLASTn searches of our EST collection and genome trace archives (http://www.ncbi.nlm.nih. gov/Traces) respectively, based on similarity to vertebrate sequences. For A. queenslandica, sequences yielding tBLASTn values lower than  $10^{-3}$  were retained, and the complete gene sequence reconstructed by retrieving overlapping sequence fragments. Gene structures (*i.e.* introns/exons) were determined using Genescan (http://genes.mit.edu/GENSCAN.html) and are available upon request. Primers and PCR conditions used for  $\beta$ -Catenin and Gsk3- $\beta$  are listed in supplementary file S1 as well as accession numbers of all sequences.

#### Alignment and phylogenetic analyses

Sequences were aligned by Clustal W (http://npsa-pbil.ibcp.fr/ cgi-bin/npsa\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\_clustalw.html). Available fragments of WNT sequence from the Homoscleromorph *Oscarella carmela* (Accession numbers: EB741370; EB741369; EB741367) were too short to be included in our data set. Ambiguously aligned regions were removed using GBlock (http://www.phylogeny.fr/phylo\_cgi/gblocks.cgi). The resulting alignment comprised 102 WNTs and 220 positions (available upon request).

Phylogenetic analyses were carried out by the maximumlikelihood (ML) method using the PhyML-2.4.4 program [49] and by Bayesian inference using the Mr Bayes-3.1.2 program [50]. The WAG [51] amino acid substitution model and a gamma distribution with four discrete categories were used.

For ML analysis, the gamma shape parameter and the proportion of invariant sites were optimized. Branch support was tested with bootstrapping (1000 replicates). For Bayesian analysis, six chains were run for 10,000,000 generations one of which was heated; after a burn-in of 2,500,000 generation every 100th tree was sampled only after posterior likelihoods reached stationary values.

#### In situ hybridizations

RNA probes were synthesized with SP6/T7 DIG RNA Labelling Kits (Roche). Actin (positive control) antisense probes were transcribed from a clone of *Oscarella lobularis* after identification in an EST collection. As negative controls, sense probes were used in parallel with antisense probes in hybridization experiments.

 $In \ situ$  hybridization was performed on both whole fixed specimens (WMHIS) and histological sections mounted on slides.

Samples were fixed in 4% paraformaldehyde overnight. For sectioning, samples were embedded in paraffin. 10 µm sections were dewaxed, and all samples and sections rehydrated in PBS/ alcohol with decreasing alcohol concentrations, followed by 10 min of 10 µg/mL Proteinase K treatment (for whole-mount samples) or 20 min in RIPA detergent treatment (for sections) (RIPA: 0.016 M NaCl; 0.02 M Tris base; 10<sup>-3</sup> M EDTA; 0.1% SDS; 0.001% Igepal; 0.5% Na-deoxycholate). Samples and histological sections were post-fixed with 4% paraformaldehyde and acetylated by 0.25% anhydride acetic solution in triethanolamine 0.1 M. After washing in PBT, samples and sections were incubated in hybridization solution and then with a DIG-labelled probe (1 µg/ml) for 48 hours at 58°C. Hybridization solution: 50% deionised formamide, 5×SCC (pH 5), 1% SDS, 50 µg/ml yeast tRNA, 50  $\mu$ g/ml heparin, Denhardt's 5× and 0.1% Tween 20. Subsequently, samples and sections were washed, at 58°C, in 50% formamide, SSC 5× pH 4.5 and then 50% formamide, SSC  $2\times$  pH 4. After blocking with 2% Blocking Reagent,1% Goat serum in MAB, both were reacted with anti-DIG antibody conjugated to alkaline phosphatase (dilution 1:2000) overnight, in a humid chamber, at 16°C. After washing and equilibration to pH 9.5, they were incubated with BM purple, alkaline phosphatase substrate in the dark at 15°C for about 24 h.

#### Treatment with GSK3β inhibitors

The pieces of *Oscarella lobularis* about 1 cm<sup>3</sup> were cut *in situ*. The collection site was "la grotte d'Endoume" in Marseilles, a four meter deep underwater cave. They were left to heal during one day *in situ*. Then, they were cultivated in Petri dishes in roughly filtered sea water only (control), with 0.5  $\mu$ M 6-bromo-indirubine-3'-oxime (BIO) [45] or with 40 mM lithium chloride (LiCl).

#### Microscopy

For scanning electron microscopy (SEM) and semi-thin sections specimens were fixed in 2.5% glutaraldehyde in a mixture of 0.4 M cacodylate buffer and seawater (1:4:5; 1120 mOsm) and post-fixed in 2%  $OsO_4$ , in seawater. Then they were dehydrated through a graded ethanol series. For SEM samples were critical

PLoS ONE | www.plosone.org

5

point-dried, sputter-coated with gold-palladium, and observed under a Hitachi S570 SEM.

For semi-thin sections dehydrated samples were embedded in Araldite resin. The sections (0.5  $\mu m$  of the thickness) were stained with toluidine blue.

#### Statistical analyses

A two-tailed Student's t-test was used to assess the statistical significance of ostia numbers between treated and control samples. Thirty  $400 \times$  fields were counted for each. A Shapiro-Wilk Normality Test confirmed that the three samples (Control, LiCl and BIO, n = 30) conformed to a normal distribution (P-value = 0.055, 0.126 and 0.979 respectively).

#### **Supporting Information**

#### **Supporting Information File S1**

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0005823.s001 (1.70 MB DOC)

#### References

- 1. Nielsen C (2008) Six major steps in animal evolution: are we derived sponge larvae? Evol Dev 10: 241–257.
- Philippe H, Derelle R, Lopez P, Pick K, Borchiellini C, et al. (2009) Phylogenomics Revives Traditional Views on Deep Animal Relationships. Curr Biol.
- Ruiz-Trillo I, Roger AJ, Burger G, Gray MW, Lang BF (2008) A phylogenomic investigation into the origin of metazoa. Mol Biol Evol 25: 664–672.
   Steenkamp ET, Wright J, Baldauf SL (2006) The protistan origins of animals
- Steenkamp ET, Wright J, Baldaut SL (2006) The protistan origins of animals and fungi. Mol Biol Evol 23: 93–106.
- Gazave E, Lapebie P, Renard E, Bezac C, Boury-Esnault N, et al. (2008) NK homeobox genes with choanocyte-specific expression in homoscleromorph sponges. Dev Genes Evol 218: 479–489.
- Maldonado M (2004) Choanoflagellates, choanocytes, and animal multicellularity. Invertebr Biol 123: 1–22.
- Magie CR, Martindale MQ (2008) Cell-cell adhesion in the cuidaria: insights into the evolution of tissue morphogenesis. Biol Bull 214: 218-232.
   Borchicllini C, Chombard C, Manuel M, Alivon E, Vacelet J, et al. (2004)
- Borchiellini C, Chombard C, Manuel M, Alivon E, Vacelet J, et al. (2004) Molecular phylogeny of Demospongiae: implications for classification and scenarios of character evolution. Mol Phylogenet Evol 32: 823–837.
   Sperling EA, Pisani D, Peterson KJ (2007) Poriferan paraphyly and its
- Sperling EA, Pisani D, Peterson KJ (2007) Poriferan paraphyly and its implications for Precambrian palaeobiology. Geol Soc London Spec Publ 286: 355–368.
- Ereskovsky A, Borchiellini C, Gazave E, Ivanisevie J, Lapébie P, et al. (2008) The Homoseleromorph sponge Oscarella lobularis, a promising sponge model in Evolutionary and Developmental Biology. Bioessays, In Press.
   Boury-Esnault N, Ereskovsky A, Bezae G, Tokina D (2003) Larval development
- Boury-Esnault N, Ereskovsky A, Bezac C, Tokina D (2003) Larval development in the Homoscleromorpha (Porifera, Demospongiae). Invertebr Biol 122: 187–202.
- Boute N, Exposito JY, Boury-Esnault N, Vacelet J, Noro N, et al. (1996) Type IV collagen in sponges, the missing link in basement membrane ubiquity. Biol Cell 88: 37–44.
- Ereskovsky A, Tokina D (2007) Asexual reproduction in homoscleromorph sponges (Portiera; Homoscleromorpha). Mar Biol 151: 425–134.
- Ereskovsky A, Tokina D (2007) Asexual reproduction in homoscleromorph sponges (Porifera; Homoscleromorpha), Marine Biology 151: 425–434.
   Ereskovsky AV, Tokina DB, Bezac C, Boury-Esnault N (2007) Metamorphosis
- Éreskovsky AV, Tokina DB, Bezac C, Boury-Esnault N (2007) Metamorphosis of cinetoblastula larvae (Homoscleromorpha, porifera). J Morphol 268: 518–528.
   Nichols SA, Dirks W, Pearse JS, King N (2006) Early evolution of animal cell
- signaling and adhesion genes. PNAS 103: 12451–12456.
- Abedin M, King N (2008) The premetazoan ancestry of cadherins. Science 319: 946–948.
- King N, Westbrook MJ, Young SL, Kuo A, Abedin M, et al. (2008) The genome of the choanoflagellate Monosiga brevicollis and the origin of metazoans. Nature 451: 783–788.
- Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol 20: 781–810.
- 20. Nusse R (2008) Whit signaling and stem cell control. Cell Res 18: 523-527.
- Hobmayer B, Rentzsch F, Kuhn K, Happel CM, von Laue CC, et al. (2000) WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. Nature 407: 186–189.
   He XC, Zhang J, Li L (2005) Cellular and molecular regulation of hematopoietic
- Tre Te, Zhang J, E. (2005) constrained and metal for the metal of the
- complexity of the Wht gene family in a sea anomore. Nature 433:156-160. 24. van Amerongen R, Mikels A, Nusse R (2008) Alternative wnt signaling is
- initiated by distinct receptors. Sci Signal 1: re9.

#### Acknowledgments

We gratefully acknowledge the significant contribution and support of the US Department of Energy Joint Genome Institute in the production of *A. queenslandica (Renieva)* genomic sequences used in this study through the Community Sequencing Program. We specially thank Laurent Meijer from the marine station of Roscoff. France for BIO donation. We are also grateful to Dr. Nicole Boury-Esnault, Dr. Jean Vacelet (Marseilles) for their assistance in sponge knowledge and critical reading of the manuscript, to Daria Tokina (St. Petersburg) for semi-thin sections, Dr. Oriol Torrents and Charline Abed for their help in illustration editing. We thank also Christian Marschal for assistance in photography, the Diving staff of the Centre d'Océanologie de Marseille and Olivier Bianchimani for his help in sampling.

#### **Author Contributions**

Conceived and designed the experiments: PL AVE EH CB. Performed the experiments: PL EG AVE RD CB. Analyzed the data: PL EG AVE RD EH CB. Contributed reagents/materials/analysis tools: PL EH CB. Wrote the paper: PL ER EH CB.

- Adell T, Thakur AN, Müller WE (2007) Isolation and characterization of Wnt pathway-related genes from Porifera. Cell Biol Int 31: 939–949.
- Adamska M, Degnan SM, Green KM, Adamski M, Craigie A, et al. (2007) Wht and TGF-beta expression in the sponge Amphimedon queenslandica and the origin of metazoan embryonic patternine. PLoS ONE 2: e1031
- origin of metazoan embryonic patterning. PLoS ONE 2: e1031.
  27. Larroux C, Fahey B, Liubicich D, Himman VF, Gauthier M, et al. (2006). Developmental expression of transcription factor genes in a demosponge: insights into the origin of metazoan multicellularity. Evol Dev 8: 150–173.
- Prud'homme B, Lartillot N, Balavoine G, Adoutte A, Vervoort M (2002) Phylogenetic analysis of the Wnt gene family. Insights from lophotrochozoan members. Curr Biol 12: 1395.
- Momose T, Derelle R, Houliston E (2008) A maternally localised Wirt ligand required for axial patterning in the enidarian Clytia hemisphaerica. Development 135: 2105–2113.
- Neumann CJ, Cohen SM (1997) Long-range action of Wingless organizes the dorsal-ventral axis of the Drosophila wing. Development 124: 871–880.
- Chang CH, Jiang TX, Lin CM, Burrus LW, Chuong CM, et al. (2004) Distinct Wnt members regulate the hierarchical morphogenesis of skin regions (spinal tract) and individual feathers. Mech Dev 121: 157–171.
- Liu F, Chu EY, Watt B, Zhang Y, Gallant NM, et al. (2008) Wht/beta-catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis. Dev Biol 313: 210–224.
- Reddy S, Andl T, Bagasra A, Lu MM, Epstein DJ, et al. (2001) Characterization of Witt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wint5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis. Mech Dev 107: 69–82.
- 34. Chu FY, Hens J, Andl T, Kairo A, Yamaguchi TP, et al. (2004) Canonical WNT signaling promotes mammary placode development and is essential for initiation of mammary gland morphogenesis. Development 131: 4819–4829.
- Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G, Birchmeier W (2001) beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. Cell 105: 533–545.
- Liu F, Thirumangalathu S, Gallant NM, Yang SH, Stoick-Cooper CL, et al. (2007) Wnt-beta-catenin signaling initiates taste papilla development. Nat Genet 39: 106–112.
- Narhi K, Jarvinen E, Birchmeier W, Taketo MM, Mikkola ML, et al. (2008) Sustained epithelial beta-catenin activity induces precocious hair development but disrupts hair follicle down-growth and hair shaft formation. Development 135: 1019–1028.
- Noramly S, Freeman A, Morgan BA (1999) beta-catenin signaling can initiate feather bud development. Development 126: 3509–3521.
- Reddy ST, Andl T, Lu MM, Morrisey EE, Millar SE (2004) Expression of Frizzled genes in developing and postnatal hair follicles. J Invest Dermatol 123: 275–282.
- Fathke C, Wilson L, Shah K, Kim B, Hocking A, et al. (2006) Wht signaling induces epithelial differentiation during cutaneous wound healing. BMC Cell Biol 7: 4.
- Jarvinen E, Salazar-Ciudad J, Birchmeier W, Taketo MM, Jernvall J, et al. (2006) Continuous tooth generation in mouse is induced by activated epithelial Wnt/beta-catenin signaling. PNAS 103: 18627–18632.
- Broun M, Gee L, Reinhardt B, Bode HR (2005) Formation of the head organizer in hydra involves the canonical Wnt pathway. Development 132: 2907–2916.
- Philipp I, Aufschnaiter R, Ozbek S, Pontasch S, Jenewein M, et al. (2009) Wnt/ beta-catenin and noncanonical Wnt signaling interact in tissue evagination in the simple cumetazoan Hydra. Proc Nad Acad Sci U S A 106: 4290–4295.

DLoS ONE | www.plosone.org

#### WNTs in Homoscleromorpha

- Hedgepeth CM, Conrad LJ, Zhang J, Huang HG, Lee VM, et al. (1997) Activation of the Writ signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action. Dev Biol 185: 82–91.
   Meijer L, Skaltsounis AL, Magiatis P, Polychronopoulos P, Knockaert M, et al. (2003) CSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. Chem Red 105: 1056
- Biol 10: 1255–1266.
  Mikkola ML, Millar SE (2006) The mammary bud as a skin appendage: unique and shared aspects of development. J Mammary Gland Biol Neoplasia 11:
- 47. Pispa J, Thesleff I (2003) Mechanisms of ectodermal organogenesis. Dev Biol 262: 195–205.
- Tyler S (2003) Epithelium-The primary building block for Metazoan complexity. Integr Comp Biol 43: 55–63.
   Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate
- Gundon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate agorithm to estimate large phylogenics by maximum likelihood. Syst Biol 52: 696–704.
   Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17: 751–755.
   Whelan S, Goldman N (2001) A general empirical model of protein evolution
- derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. Mol Biol Evol 18: 691–699.

## ANNEXE IV

Protocoles d'immunohistochimie et d'inhibition chimique

# Protocole d'immunohistochimie utilisé pour les expériences de localisation de la protéine Notch

Après récolte, les échantillons d'éponge frais ont été fixés 24h soit dans de l'éthanol 100% soit dans du méthanol 100 % puis stockés à -20 °C. Un fragment de ces échantillons a été prélevé et inclus en paraffine (bains successifs). Des coupes de différentes épaisseurs (6, 8 ou 10 µm) ont été réalisées au microtome et fixées sur des lames Superfrost (permettant une meilleure adhérence des tissus) par Chantal Mahé-Bézac. Les lames ont ensuite été déparaffinées dans du LMR<sup>®</sup> (substitut de Xylène) et progressivement réhydratées. Dans un premier temps, elles ont été saturée avec une solution de blocage (Tampon Pipes, Sérum Albumine Bovine (BSA) et Triton X100) et ensuite le premier anticorps a été ajouté (concentration variable en fonction de l'anticorps) et incubé soit 30 min à température ambiante soit la nuit à 4°C. Après plusieurs lavages des lames avec la solution de blocage, l'anticorps secondaire avec marquage fluorescent a été ajouté et incubé dans le noir soit 30 min à température ambiante soit la nuit à 4°C. Les lames sont ensuite lavées dans une solution tampon et du DAPI (qui marque les noyaux des cellules en bleu fluorescent) a été ajouté pendant 15 min. Après quelques lavages dans la solution tampon, une goutte de solution Cityfluor (solution ralentissant la disparition du signal fluorescent) est déposée et les lames sont ensuite recouvertes d'une lamelle et prêtes à être observées au microscope à épifluorescence. Nous avons également testé une méthode d'amplification du signal fluorescent via l'utilisation d'un kit « Kit Renaissance TSA fluorescence systems tyramide signal amplification, for Fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry » commercialisé par Perkin Elmer. Ce kit nécessite de réaliser une étape supplémentaire et l'utilisation d'anticorps secondaires biotinylés. Dans notre cas, le signal observé sans amplification était suffisant et cette étape après avoir été testée une fois n'a plus été refaite. Ce protocle a été modifié d'après (Mukhina et al., 2006 ; Abedin et King, 2008).

### Protocole d'inhibition chimique de la voie Notch par le DAPT

Après récolte, les éponges ont été nettoyées et coupées en petits fragments d'environ 0,5 mm<sup>3</sup>. Ces fragments ont été laissés pendant environ trois jours dans les aquariums de la station afin de leur permettre de se régénérer. En effet, nous ne voulions pas qu'un phénomène supplémentaire tel que la régénération des fragments puisse interférer avec notre expérience. Après cela les fragments d'éponges ont été placés dans des boîtes de Pétri en verre autoclavées (permettant une meilleure survie que le plastique) contenant diverses solutions pendant 2h, 6h, 24h ou 48h à 15 °C. Le DAPT est commercialisé sous forme de poudre. Il a été resuspendu dans du DMSO pour obtenir une solution stock à 100 mM. La solution de travail (100 µM) est préparée à partir de la solution stock diluée dans de l'eau de mer filtrée. Pour chaque temps, trois conditions ont été réalisées : traitement au DAPT, témoin négatif contenant une solution de DMSO au 1/1000<sup>e</sup>, et témoin négatif contenant de l'eau de mer filtrée. Le DAPT étant connu pour avoir un temps d'action assez court (M. Vervoort et A. Pasini, communications personnelles), il a été remplacé toutes les 12h pour les traitements durant 24h et 48h. Les échantillons ont été fixés dans l'éthanol 100 % à -20 °C pour être ensuite inclus. Ce protocle a été modifié d'après (Kasbauer et al., 2007).

#### Résumé

Le système neuro-sensoriel est considéré comme une synapomorphie des eumétazoaires, sur la base de la présence, chez ces organismes, du neurone. Les éponges, en tant que métazoaires non-bilatériens, sont d'un intérêt tout particulier pour comprendre l'origine et l'évolution de nombreux processus développementaux, tels que la mise en place du système neuro-sensoriel. Même si elles ne possèdent pas de neurones, ce ne sont pas des organismes passifs; elles présentent des formes de communication chimiques et électriques. Cependant, rien n'est actuellement connu concernant les types cellulaires ni les mécanismes précis impliqués dans ces processus. Dans cette perspective de recherche, l'éponge homoscléromorphe Oscarella lobularis a été choisie comme modèle lors de cette thèse. Dans un premier temps, différents travaux pour la caractériser ont été réalisés. L'étude de ses relations phylogénétiques au sein des homoscléromorphes a notamment permis de restaurer une ancienne famille : les Oscarellidae. Je me suis attachée par la suite à identifier des gènes connus pour être impliqués dans la mise en place du système nerveux chez les eumétazoaires. Parmi les mécanismes moléculaires connus, la voie de signalisation Notch semble incontournable chez les bilatériens. Son origine et son évolution ont été étudiées à l'échelle des eucaryotes, révélant ainsi que cette voie est une synapomorphie des métazoaires bien que plusieurs de ses composants soient plus anciens. Mes résultats d'immunolocalisation de la protéine Notch révèlent un marquage dans les choanocytes. En parallèle, j'ai également montré l'expression dans ces cellules d'un facteur de transcription apparenté aux  $NK_{6-7}$ , familles jouant un rôle dans la neurogenèse chez les bilatériens. Ces résultats semblent appuyer une hypothèse récente proposant que les choanocytes pourraient avoir des fonctions neuro-sensorielles. L'intégration d'autres données (moléculaires, physiologiques, biochimiques...) reste cependant indispensable à la validation de cette hypothèse et sont en cours de développement. Plus globalement, ces résultats vont dans le sens d'hypothèses récentes qui suggèrent que l'ancêtre commun des métazoaires présentait déjà une relative complexité moléculaire et fonctionnelle, même si ces fonctions devaient être assurées par des cellules multifonctionnelles.

#### Abstract

The neuro-sensory system is considered to be a eumetazoan synapomorphy. Indeed, all these organisms share a specifialized cell: the neurone. Sponges, as non-bilateiran, are of special interest to investigate the origin and evolution of developmental processes, such as the emergence of neuro-sensory system. Although they are nerveless, sponges are not passive organisms; they harbour chemical and electric communication. Nevertheless, presently, nearly nothing is known concerning implicated cell types or conduction mechanisms. In the aim of understanding the nervous system origin, the homoscleromorph sponge Oscarella lobularis has been used as a sponge model in this thesis. First, diverse studies have been realised in order to characterise this species. The study of its phylogenetic position among homoscleromorph allowed us to restore an ancient family: the Oscarellidae. Then, I tried to identify genes that are known to be implicated in eumetazoan nervous system patterning. Among them, the Notch signalling pathway is crucial. Its origin and evolution have been investigated at the eukaryotic scale, revealing that this pathway is a metazoan synapomorphy, although several components emerged earlier. Notch protein immunolocalisation results in the staining of choanocytes. In parallel, I have also reported the expression pattern exclusively in this cell type, of a transcription factors related to  $NK_{6.7}$ , those families being implicated in bilaterian neurogenesis. These results are in agreement with a recent hypothesis proposing that choanocytes may harbor neuro-sensory functions. The integration of other molecular, physiological and biochemical data is crucial to validate this hypothesis and is in progress. More globally, these results are in agreement with recent hypotheses suggesting a relative molecular and functional complexity of the metazoan common ancestor, although diverse functions may have been assumed by multifunctional cells.