

Capsule, lumière et développement neuronal
de l'embryon de seiche, *Sepia officinalis*
Capsule, light and neuronal development in cuttlefish embryo
CALYPSO : Egg Capsule and Light-Protection in *Sepia officinalis*

La lumière, par les informations environnementales qu'elle peut véhiculer, est un élément essentiel au développement du système nerveux et à l'équilibre physiologique des métazoaires. Ainsi, la quantité et la qualité de la source lumineuse peuvent entre autres modifier le développement et la croissance des individus, changer la pigmentation de la peau et intervenir dans la neurogenèse.

Ces effets de la lumière sur les organismes en milieu aquatique sont peu étudiés. Or, les radiations solaires peuvent avoir des conséquences importantes, en particulier sur les espèces qui montrent des stades fixés en zone côtière au cours de leur cycle de vie. C'est le cas du céphalopode *Sepia officinalis*, notre modèle qui pond ses œufs près des côtes, dans la zone intertidale, où l'atténuation de la lumière par l'eau est faible ou nulle. Les Céphalopodes sont souvent comparés aux vertébrés pour leurs extraordinaires capacités visuelles et cognitives. *Sepia officinalis* a été choisie en raison (i) de son cerveau hautement centralisé et hiérarchisé permettant un riche répertoire comportemental, dont le camouflage dynamique, (ii) de ses yeux, analogues à ceux des vertébrés et guidant ces comportements élaborés, (iii) de sa potentielle perception extra-oculaire de la lumière (peau, système nerveux central).

La seiche, notre modèle, présente la particularité de produire des œufs dont la capsule est noire et composée de couches multiples. La mélanine de la capsule est considérée comme une protection contre les UV. Au cours du développement, la capsule est de plus en plus fine et les enveloppes s'étirent. L'effet de cette modification n'est pas connu. La quantité de lumière traversant la capsule augmente vraisemblablement. Surtout, la qualité de la lumière peut être modifiée par la structure de la capsule.

La photoréactivité de l'embryon est démontrée à partir du stade 25. Elle semble liée au développement des yeux, mais aussi à d'autres organes, comme la peau, le cerveau et les lobes optiques. En effet, ces organes contiennent des molécules photosensibles, suggérant une perception profonde des informations lumineuses au travers de la capsule avant éclosion. Notre équipe explore actuellement le répertoire et la dynamique d'expression de certaines de ces molécules détectrices de lumière au cours du développement embryonnaire tardif (Bonadè et al., 2020). Nos résultats suggèrent fortement la mise en place précoce du système nerveux sensoriel embryonnaire, avec un accroissement des capacités cognitives et de contrôle des comportements (motifs cutanés) au cours du développement. Ainsi, la lumière est susceptible d'être un facteur critique du développement et de la maturation neuronale et cérébrale chez l'embryon de *S. officinalis* nonobstant la capsule noire qui entoure l'embryon.

Question : la capsule influence-t-elle la photosensibilité, la neurogenèse et, *in fine*, les capacités cognitives des embryons de *Sepia officinalis* en contrôlant la quantité et les propriétés de la lumière (sous-marine) atteignant l'embryon ?

OBJECTIFS

Dans ce projet de thèse, nous proposons d'objectiver l'influence de la lumière, qualitativement (spectres différents) et quantitativement (intensités différentes) sur le développement de *Sepia officinalis*. Il s'agira de déterminer les particularités optiques de la capsule concernant les propriétés de la lumière transmises à l'embryon et l'expression temporelle des gènes effectivement exprimés en réponse à ces conditions. Nous déterminerons la chronologie de (et la corrélation entre) l'apparition respective des molécules et la fonction visuelle/photosensible au cours du développement des yeux et des organes extra-oculaires photosensibles, peau, cerveau, lobes optiques.

Partie 1 - Caractérisation des effets physiques et biologiques de la capsule

Il s'agit de mesurer la qualité et la quantité de la lumière entrante et sortante au travers de la capsule, et de tester l'expression de gènes avec et sans capsule au cours du développement.

L'originalité de ce projet est de tester les propriétés optiques de la capsule noire des embryons de *Sepia officinalis*, dans l'environnement marin. Physiquement, cette structure multicouche agit-elle réellement comme un écran réflecteur (aka quelles sont ses propriétés de réflexion spectrale) et/ou un filtre (aka quelles sont ses propriétés d'absorption spectrale) ? Nous voulons aussi caractériser ici des conséquences biologiques de la présence de cette structure sur le développement de l'embryon.

Partie 2 - La lumière a-t-elle un effet sur l'embryogenèse et les capacités cognitives à l'éclosion ?

Dans cette partie, nous cherchons à tester l'influence de la qualité et de la quantité de lumière sur la pigmentation et/ou le comportement, en (i) caractérisant la structuration des motifs cutanés au cours du développement et (ii) évaluant l'expression des gènes photosensibles, des gènes intervenant dans la neurogenèse et le comportement, des gènes intervenant dans la pigmentation et leurs réponses aux variations de qualité/quantité de lumière.

Cette étude permettra de comprendre comment une structure biologique peut constituer un écran protecteur et quel rôle elle joue dans le développement et l'apparition de la photosensibilité. Elle permettra d'estimer l'importance de la qualité et de la quantité de lumière pour un développement correct de la fonction visuelle et des comportements dont ceux liés au camouflage.

MISE EN OEUVRE

Modèle d'étude

La seiche *Sepia officinalis* est étudié depuis de nombreuses années en éco-évo-dévo dans l'équipe (Bassaglia et al. 2013; Boletzky et al. 2016). Les œufs sont obtenus grâce à une collaboration avec la station biologique de Roscoff (Sorbonne Université), où les expérimentations sont menées, sous contrôle du comité d'éthique (DAP déposée).

Expérimentations & Matériel biologique

Les œufs sont exposés à des types différents de sources lumineuses d'intensités différentes. Dès la ponte et tout au long du développement, des mesures de la quantité/qualité (spectre) de lumière traversant la capsule seront effectuées, les motifs colorés cutanés analysés et les expressions des gènes cibles seront déterminées dans les organes d'intérêt.

Caractérisation optique des capsules

Les propriétés optiques intrinsèques de la capsule seront déterminées en mesurant la lumière transmise et réfléchi par la capsule pour comprendre la part de filtrage (absorption). Un modèle optique développé dans l'équipe de la co-encadrante permet, à partir de données morphologiques (épaisseur, taille des diffuseurs) et optiques (coefficients de diffusion et d'absorption) de prédire les propriétés optiques d'un système multicouche. A partir des informations morphologiques issues des observations en microscopie, et les données optiques issues des mesures, ce modèle sera adapté au système étudié.

Analyse des patterns colorés de la peau

Des photos de la peau des embryons soumis aux différentes sources lumineuses seront analysées. Des méthodes de traitement et d'analyse d'images basées sur la morphologie mathématique, maîtrisées par la co-encadrante, seront utilisées.

Expression des Gènes cibles

Le niveau d'expression de gènes intervenant dans la photosensibilité (opsines, cryptochromes, rétinochrome), la pigmentation (tyrosinase, tyrosine hydroxylase, KMO, TDO), dans la neurogenèse et les capacités cognitives (NeuN, Nurr, Récepteurs à la dopamine), sera évalué dans 4 organes cibles : l'œil, le cerveau, les lobes optiques et la peau. Les méthodes d'extractions sont toutes utilisées en routine et standardisées pour notre modèle et le niveau d'expression est quantifié par digitalPCR.

Adéquation à l'Institut

Ce projet de thèse s'intéresse à un facteur environnemental, la lumière encore peu prise en compte dans les études sur les changements d'origine anthropique. Sa perturbation par les activités humaines en zone côtière (habitat, activité portuaires, trafic maritime) représente un facteur de risque environnemental potentiellement important pour le cycle de vie de *S. officinalis*, espèce pourtant a priori protégée par la capsule au cours de son développement et capable d'adaptations remarquables grâce à son système nerveux très développé. Si ce travail les confirme, ces effets seraient donc encore plus cruciaux pour de nombreuses autres espèces plus directement exposées. Ce sujet interdisciplinaire (physique / environnement / biologie des organismes) s'inscrit donc dans le second axe (Changements globaux, risques et adaptations) développé dans l'institut.

La collaboration entre biologistes et physiciens permettra d'établir un modèle de propagation de la lumière dans la structure multicouche et colorée de la capsule. Cette partie représente une source potentielle d'applications translationnelles bioinspirées.

Rôle des encadrant.e.s

Laure Bonnaud-Ponticelli, PR MNHN, UMR BOREA co-encadrera la thèse (70%) en suivant le candidat sur la partie Biologie moléculaire et expression de gènes co-analyse des résultats.

Christine Andraud, PR MNHN, (Centre de Recherche sur la Conservation) co-encadrera la thèse sur la partie optique et physique, la mise au point des mesures, les analyses et la modélisation optique.

Yann Bassaglia, MC UPEC (UMR BOREA) participera à l'encadrement sur la partie histologie et phylogénie moléculaire, analyses.

Gaëtan Schires, IE CNRS (Station Biologique Roscoff-SU) sera responsable avec les encadrant.e.s de la mise en place de l'expérimentation et la conduira avec le doctorant.

Profil du candidat : Un candidat pour ce projet de thèse, Luis Molina-Carillo, est en CDD depuis 1 an dans le laboratoire BOREA, en tant que IE/Chargé d'études scientifiques. Il contribue à un projet lié à la perception des UV par l'embryon de seiche. Il est donc non seulement compétent sur le modèle mais il maîtrise aussi parfaitement les techniques de biologie moléculaire utilisées. Il a également contribué aux expérimentations mises en place sur l'influence des UV à la station Biologique de Roscoff.

Références des encadrant.e.s en lien avec le sujet

Bassaglia Y., Buresi A., Franko D., Andouche A., Baratte S., Bonnaud L. 2013. « Sepia Officinalis: A New Biological Model for Eco-Evo-Devo Studies ». *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* 447: 4-13.

Boletzky S.V., Andouche A., Bonnaud-Ponticelli L. 2016. « A developmental table of embryogenesis in Sepia officinalis ». *Vie et Milieu* 66 (1): 11-23.

Imarazene B., Andouche A., Bassaglia Y., Lopez P-J., Bonnaud-Ponticelli L. 2017. Eye Development in Sepia officinalis embryo: What the Uncommon Gene Expression Profiles Tell Us about Eye Evolution. *Frontiers Physiol* 8.

Bonadè M., Ogura A., Corre E., Bassaglia Y., Bonnaud-Ponticelli L. 2020. « Diversity of Light Sensing Molecules and Their Expression During the Embryogenesis of the Cuttlefish (Sepia Officinalis) ». *Frontiers Physiol.* 11.

Andraud C., Beghdadi A., Haslund E., Hilfer R., Lafait J., et Virgin B. 1997. "Local entropy characterization of correlated random microstructures." *Physica A* 235:307- 318.

J. Lafait, C. Andraud, S. Berthier, J. Boulenguez, P. Callet, S. Dumazet, M. Rassart and J.-P. Vigneron, 2010. "Modeling the vivid white color of the beetle *Calothyrza margaritifera*", *Mater. Sci. Eng. B* 169, 1-3) 16-22.

Genty-Vincent A., Phan Van Song T., Andraud C., Menu M. 2017. "Four-flux model of the light scattering in porous varnish and paint layers: towards understanding the visual appearance of altered blanched easel oil paintings". *Applied Physics A*, 123:473