

## Mémoire

**Auteur** : Rousseaux, Juliette

**Promoteur(s)** : Roberty, Stéphane; 12746

**Faculté** : Faculté des Sciences

**Diplôme** : Master en biologie des organismes et écologie, à finalité approfondie

**Année académique** : 2020-2021

**URI/URL** : <http://hdl.handle.net/2268.2/12620>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

# **Bioluminescence chez *Amphiura filiformis* (O.F.Müller): histoire évolutive et expression de la luciférase**



Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Master en Biologie des Organismes et Écologie, à finalité approfondie par

**Juliette Rousseaux**

Promoteur : Jérôme Delroisse  
Co-promoteur : Stéphane Roberty

Année académique 2020-2021

# Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1	La lumière dans le monde vivant.....	1
1.2	Réaction de bioluminescence.....	1
1.3	Diversité au sein de la bioluminescence.....	2
1.3.1	Fonctions.....	3
1.3.2	Systèmes bioluminescents.....	3
1.4	Bioluminescence et évolution.....	5
1.4.1	Convergence évolutive.....	5
1.4.2	Evolution des luciférase.....	6
1.5	Bioluminescence chez les échinodermes.....	8
1.5.1	Echinodermes.....	8
1.5.2	Ophiures.....	8
1.5.3	<i>Amphiura filiformis</i> , une espèce modèle émergente.....	9
1.6	Objectifs.....	13
1.6.1	Émergence évolutive de la bioluminescence chez <i>A. filiformis</i> .....	13
1.6.2	Système bioluminescent chez <i>A. filiformis</i> .....	13
<b>2</b>	<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>14</b>
2.1	Analyse in silico.....	14
2.1.1	Avant-propos.....	14
2.1.2	Matériel et méthodes.....	18
2.2	Analyses en laboratoire.....	22
2.2.1	Collecte des échantillons.....	22
2.2.2	Réalisation de coupes histologiques.....	22
2.2.3	Immunohistochimie.....	23
2.2.4	Expression des transcrits au sein des tissus.....	25
<b>3</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>26</b>
3.1	Evolution des protéines homologues RLuc/HD.....	26
3.1.1	Distribution des protéines homologues RLuc/HD dans l'arbre du vivant.....	26
3.1.2	Reconstructions phylogénétiques basées sur les séquences homologues.....	26
3.1.3	Etude de la structure des gènes homologues de RLuc/HD.....	28
3.1.4	Similarité par rapport à RLuc et HD.....	29
3.1.5	Analyse par "clustering".....	30
3.1.6	Site actif et structure 3D des protéines.....	30
3.1.7	Etude du niveau d'expression des gènes de luciférase chez <i>A. filiformis</i> .....	31
3.2	Bioluminescence et expression de la luciférase chez <i>A. filiformis</i> .....	32
3.2.1	Bioluminescence chez <i>A. filiformis</i> .....	32
3.2.2	Microscopie et histologie.....	33
3.2.3	Expression de la luciférase chez <i>A. filiformis</i> .....	34
<b>4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>42</b>
4.1	Origine de la bioluminescence chez <i>A. filiformis</i> .....	42
4.2	Manifestation de la bioluminescence chez <i>A. filiformis</i> .....	45
<b>5</b>	<b>Conclusion et perspectives futures.....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>Bibliographie.....</b>	<b>50</b>

## Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Jérôme DELROISSE pour son accompagnement, pour sa pédagogie, pour sa patience, pour la confiance et le temps qu'il m'a accordés ainsi que pour les différents enseignements offerts tout au long de ce travail.

Je voudrais remercier également le Docteur Stéphane ROBERTY pour le suivi effectué tout au long de ce mémoire et ses conseils précieux.

Je voudrais témoigner ma gratitude aux Docteurs EECKHAUT et FLAMMANG pour leur accueil au sein du laboratoire de Biologie des Organismes Marins et Biomimétisme. Je les remercie de m'avoir permis de construire un projet qui me correspond.

Je remercie également l'ensemble des membres du laboratoire pour leur amitié et leur bonne humeur sans faille. En particulier Morgane, Marie, Emilie pour leur soutien et pour leur implication dans l'enseignement des méthodes scientifiques; ainsi que les mémorants : Noé, Fabien, Célia, François, Cloé, Joris, Antoine, Quentin et Guillaume pour ces moments partagés.

Je voudrais remercier l'ensemble de mes proches, ma famille et mes amis, qui m'ont accompagnée depuis le début de mes études. Merci à Océane, Sébastien, Thomas, Mayli, Julie, Florian, Nikita, Tiziana, qui ont rendu cette aventure si belle.

Je voudrais remercier particulièrement ma maman, pour sa patience, son écoute et son implication dans la relecture de ce travail ainsi que Floriane, ma soeur aînée qui a su me guider et m'inspirer.

Et enfin, une intention particulière pour Jordan, mon compagnon, qui m'a supportée et encouragée dans mes différents états d'âme tout au long de ces années.

## Résumé

La bioluminescence, c'est-à-dire, l'émission et la production de lumière par les organismes vivants, est un phénomène très répandu dans le milieu marin. Ce processus, présent dans de nombreux phyla, est associé à une grande diversité de fonctions biologiques et d'un point de vue moléculaire, différents systèmes photogènes (enzymes luciférases et substrats luciférines) sont utilisés par les organismes lumineux. Concernant les enzymes, diverses luciférases sont apparues de manière convergente dans l'évolution et celles-ci sont souvent spécifiques au taxon considéré. Pourtant, l'ophiure *Amphiura filiformis* utilise une luciférase homologue avec la luciférase d'un cnidaire (*Renilla reniformis*), une situation étonnante étant donné l'éloignement phylogénétique des deux organismes.

Le premier objectif de ce travail visait à mieux comprendre l'évolution des gènes de luciférases au sein de ces deux lignées. Ces questions ont été examinées par des recherches *in silico*, comprenant notamment la construction d'arbres phylogénétiques basés sur la recherche de séquences homologues dans l'ensemble du vivant et l'étude de la structure des gènes de luciférase. Les résultats de ces recherches suggèrent que la présence de l'enzyme luciférase chez *A. filiformis* et chez *R. reniformis* serait le résultat d'un ou plusieurs événement(s) de transferts horizontaux de gènes à partir des bactéries. La fonction ancestrale associée aux "gènes bactériens" (haloalkane déhalogénase) aurait été conservée chez certains taxa mais chez les cnidaires et les échinodermes, on suspecte une cooptation -apparue de manière parallèle dans les deux lignées- de gènes ancestraux en gènes codant pour une enzyme luciférase ou une enzyme bifonctionnelle (haloalkane déhalogénase-luciférase).

Le second objectif du travail consistait à caractériser l'expression de l'enzyme luciférase au sein des tissus de l'ophiure afin de compléter les données existantes et de mieux comprendre les aspects cellulaires de la bioluminescence de l'espèce. L'expression de la luciférase a été investiguée par des immunodétections réalisées à l'aide de différents anticorps dirigés contre la luciférase de *R. reniformis*. Ces expériences ont montré l'expression de l'enzyme au niveau des piquants de l'ophiure correspondant au siège d'émission de la lumière chez cette espèce, et deux patrons d'expression ont été révélés : un marquage localisé à la base des piquants ainsi qu'un marquage longiforme s'étendant tout au long du piquant. D'autres sites d'expression potentiels ont été localisés au niveau de l'épiderme du bras et des podia.

Les résultats reflètent une évolution complexe des gènes de luciférase à travers l'arbre de la vie et encouragent des études complémentaires sur la compréhension de la dynamique cellulaire de la bioluminescence chez cette ophiure.

# **FIGURES ET TABLEAUX**

## **Figures**

Figure 1.1 : Schéma d'émission d'un photon.

Figure 1.2 : Réaction de bioluminescence.

Figure 1.3 : Diagramme des fonctions connues de la bioluminescence (Haddock *et al.*, 2010)

Figure 1.4 : Représentation de la similarité des protéines bioluminescentes.

Figure 1.5 : Anatomie externe de différentes ophiures.

Figure 1.6 : Description de l'espèce *A. filiformis* et de son mode de vie.

Figure 1.7 : Caractéristiques de la bioluminescence d'*A. filiformis*.

Figure 2.1 : Distribution des protéines homologues RLuc/HD chez les métazoaires et les bactéries et hypothèses évolutives.

Figure 2.2 : Etapes de l'immunofluorescence sur coupe.

Figure 2.3 : Etapes de stimulation de la bioluminescence sur *A. filiformis*.

Figure 3.1 : Constructions phylogénétiques regroupant les séquences protéiques homologues de RLuc/HD de bactéries, de cnidaires et d'échinodermes.

Figure 3.2 : Arbre phylogénétique regroupant les séquences protéiques homologues de RLuc/HD de bactéries, de cnidaires et d'échinodermes, enraciné avec des séquences d'époxide-hydrolase.

Figure 3.3 : Structure des gènes homologues RLuc/HD.

Figure 3.4 : Structure des gènes homologues de RLuc/HD chez *A. filiformis*.

Figure 3.5 : Pourcentage de similarité par rapport à RLuc de protéines RLuc-homologues de cnidaires, d'échinodermes et de bactéries.

Figure 3.6 : Pourcentage de similarité par rapport à HD de protéines RLuc-homologues de cnidaires, d'échinodermes et de bactéries.

Figure 3.7 : Analyse en clustering représentant la similarité entre les séquences homologues de RLuc/HD chez les métazoaires et les bactéries.

Figure 3.8 : Alignement de séquences protéiques comprenant les séquences des modèles 3D de référence ainsi que les séquences de luciférase et de HD de différents organismes.

Figure 3.9 : Résultats de l'amplification d'ADNc de gènes de luciférase à partir d'un extrait de bras d'ophiure.

Figure 3.10 : Bioluminescence provoquée par stimulation mécanique chez *A. filiformis*.

Figure 3.11 : Anatomie d'un bras d'*A. filiformis*.

Figure 3.12 : Immunodétection de RLucA sur coupe transversale de bras d'*A. filiformis* et d'*O. albida*.

Figure 3.13 : Immunodétection de RLuc C sur coupe transversale de bras d'*Amphiura filiformis*.

Figure 3.14 : Immunodétection en Whole-Mount de RLuc C sur un bras entier d'*Amphiura filiformis* positionné face orale.

Figure 3.15 : Immunodétection de RLuc A et C sur des bras d'*Amphiura filiformis*.

Figure 3.16 : Immunodétection de l'opsine-c sur coupes transversales de bras d'*Amphiura filiformis*.

## **Tableaux**

Tableau 2.1 : Informations sur les lots d'ophiures collectés pour les expériences.

Tableau 3.1 : Résultats de la création de modèles 3D à partir de séquences protéiques de luciférase chez *Amphiura filiformis*, *Renilla reniformis*, *Pyrosoma atlanticum* et *Strongylocentrotus purpuratus*.

Tableau 3.2 : Présence ou absence de marquage luciférase dans diverses structures biologiques selon plusieurs traitements.

Tableau 3.3 : Tableau récapitulatif des expériences d'immunodétection de RLuc A, RLuc C et de l'Opsine C sur des échantillons en coupe et en Whole-Mount d'*A. filiformis* et d'*O. albida*.

# 1 INTRODUCTION

---

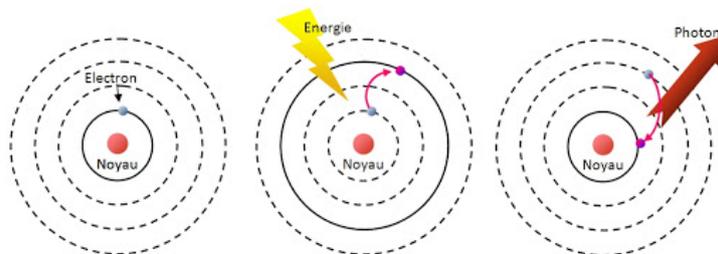
## 1.1 La lumière dans le monde vivant

La lumière constitue un des éléments les plus importants pour le maintien de la vie sur Terre. Elle est présente dans la majorité des écosystèmes de notre planète et seuls quelques rares écosystèmes connaissent une absence totale de lumière. Pourtant, dans les milieux où la lumière du Soleil n'est plus accessible, d'autres sources lumineuses semblent émerger (Haddock *et al.*, 2010). Effectivement, la production de lumière est une qualité qui se voit partagée entre les étoiles et ... certains êtres vivants ! La production de lumière par les organismes vivants est appelée « bioluminescence » (Harvey, 1916).

*“The only luminous stars the man can reach are the luminous seastars” – Prof. J. Mallefet*

## 1.2 Réaction de bioluminescence

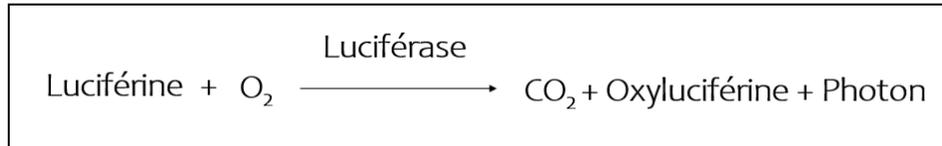
Bien que divers mécanismes de production de lumière existent (p. ex., bioluminescence, électroluminescence,...), le principe fondamental sous-jacent est quant à lui toujours identique et est à appréhender au niveau atomique : un apport d'énergie excite les électrons, les faisant passer à un niveau d'énergie supérieur instable, ce qui favorise un retour des électrons à leur niveau d'énergie fondamental, provoquant la libération d'un photon (**Fig.1.1**).



**Figure 1.1:** Schéma d'émission d'un photon (Trouillet, 2016)

Le terme « bioluminescence » est défini comme un type de chimiluminescence. Dans ce cas, l'apport d'énergie nécessaire à l'émission d'un photon est fourni par le réarrangement des atomes lors d'une réaction chimique (Morse, 2013). La particularité de la bioluminescence est

que la réaction nécessite la présence d'une enzyme, la luciférase (Wilson & Hastings, 1998). Cette réaction bioluminescente implique en plus de l'enzyme, un substrat que l'on appelle la luciférine, ainsi que de l'oxygène moléculaire. La réaction consiste en l'oxydation de la luciférine, catalysée par l'enzyme luciférase, aboutissant à la formation d'une molécule électroniquement excitée qui, en revenant à son état fondamental stable, émettra un photon et provoquera la production de dioxyde de carbone et d'une forme oxydée de la luciférine (Morse, 2013 ; **Fig.1.2**).



**Figure 1.2** : Réaction de bioluminescence

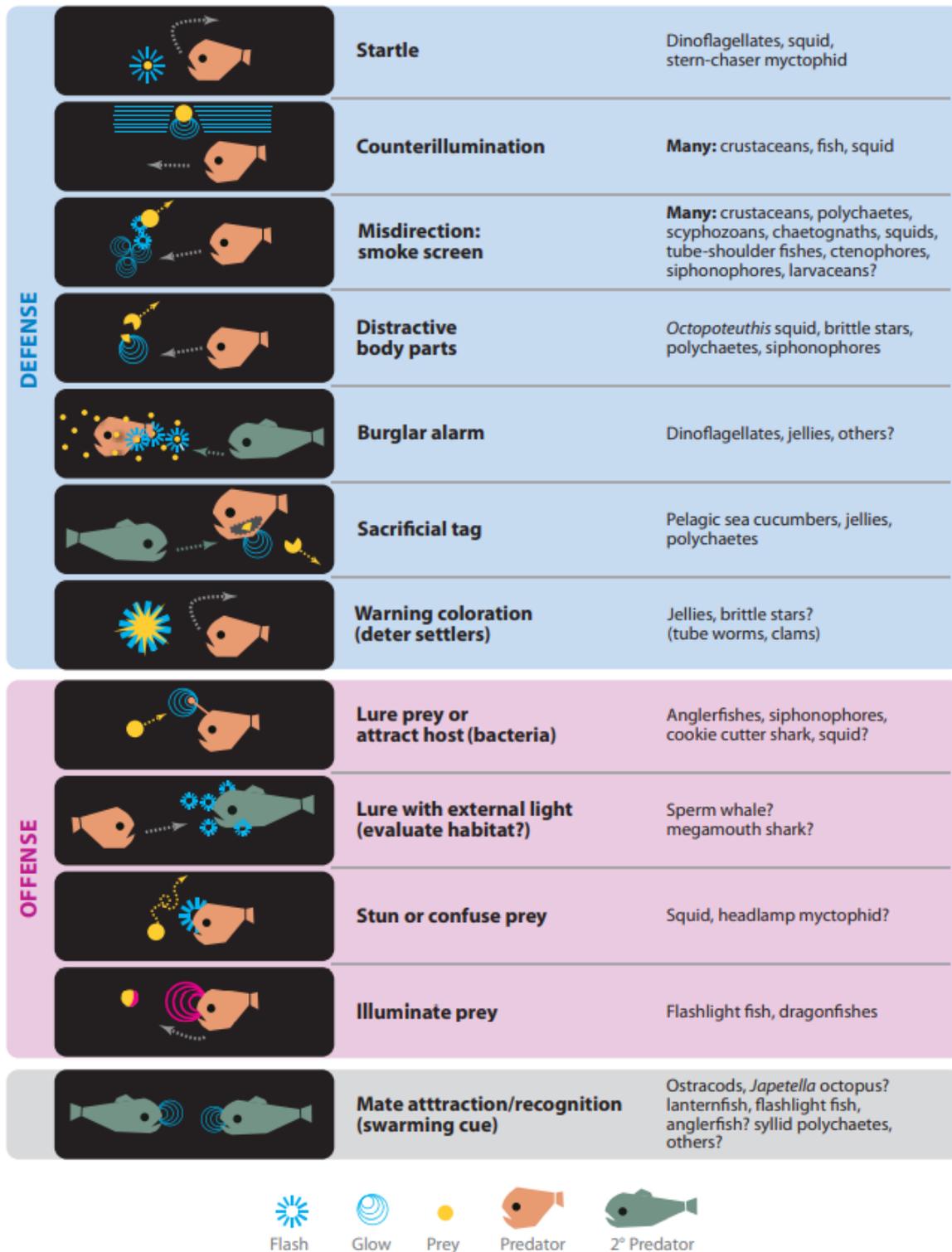
Chez certains groupes, on trouve une photoprotéine plutôt qu'une luciférase : celle-ci est définie comme un complexe protéique préalablement associé à la luciférine et à l'oxygène. Ce complexe est inactif et nécessite l'intervention de  $\text{Ca}^{2+}$  pour que la réaction s'amorce (Mc Capra, 1976).

### **1.3 Diversité au sein de la bioluminescence**

La bioluminescence est un phénomène répandu dans le monde du vivant. La bioluminescence est observée chez au moins 17 phyla différents (Delroisse *et al.*, 2021) et dans plus de 700 genres (Widder, 2010). La diversité des organismes bioluminescents s'étend des bactéries jusqu'aux poissons (Haddock *et al.*, 2010).

En terme de nombre d'individus, le phénomène est très fréquent, cependant, ce n'est pas le cas si on considère le nombre de genres qui présentent des espèces bioluminescentes car seuls 0,2% des genres sont concernés (Mallefet, 2009).

Du point de vue écologique, les espèces lumineuses sont répertoriées dans de nombreux écosystèmes, allant du milieu terrestre jusqu'aux abysses (Haddock *et al.*, 2010). On observe toutefois une prédominance marquée pour le milieu marin (Haddock *et al.*, 2010) et environ 80% des organismes « lumineux » décrits s'avèrent être des espèces marines (Shimomura, 2006). De plus, parmi les phyla bioluminescents identifiés, tous sont représentés en milieu marin (Mallefet *et al.*, 2009). La présence d'organismes bioluminescents dans de nombreux milieux et phyla s'accompagne d'une grande diversité de fonctions et de systèmes bioluminescents, ceux-ci sont décrits ci-après.



**Figure 1.3 :** Diagramme des fonctions connues de la bioluminescence (Haddock et al., 2010).

### **1.3.1 Fonctions**

Un nombre important de fonctions biologiques diverses a été relevé, et un même organisme jouit souvent des avantages multiples que lui procure la bioluminescence (Haddock *et al.*, 2010). En réalité, la lumière représente un canal efficace pour la communication inter- et intraspécifique : sa portée est importante, un signal lumineux peut être perçu jusqu'à plusieurs dizaines de mètres (Turner *et al.*, 2009), et sa propagation est rapide. En comparaison avec les signaux acoustiques et chimiques, les signaux acoustiques possèdent également une longue portée mais ne présentent pas de direction claire, et les signaux chimiques se transmettent lentement (Haddock *et al.*, 2010). Dotée de ces avantages, la lumière est donc utilisée dans de nombreuses « situations ».

Les fonctions de la bioluminescence étant multiples, elles ont été regroupées en trois catégories distinctes, à savoir (i) la défense contre un prédateur, (ii) l'attaque d'une proie et (iii) la communication intraspécifique (Haddock *et al.*, 2010 ; **Fig.1.3**). Au sein de ces catégories, on peut par exemple trouver un système de défense consistant à expulser un liquide bioluminescent, servant à brouiller la vision du prédateur, on retrouve ce moyen de défense chez divers organismes dont des copépodes, crevettes et cténophores (Haddock & Case, 1999). Par rapport à l'aspect plus offensif, les organismes peuvent par exemple produire de la lumière pour attirer leurs proies, cela est possible notamment en utilisant un organe lumineux comme appât (Robison *et al.*, 2003). Quant à la communication intraspécifique, l'exemple le plus connu est certainement celui des lucioles qui émettent des « clics » lumineux lors de la recherche de partenaires sexuels (Woods Jr. *et al.*, 2007).

### **1.3.2 Systèmes bioluminescents**

Concernant les mécanismes engendrant la bioluminescence, on observe des variations notamment en termes de réaction, nature de la lumière émise, origine de la bioluminescence et structures bioluminescentes.

#### **1.3.2.1 Réaction lumineuse**

A propos de la réaction, la luciférine et la luciférase sont des termes génériques, ce qui signifie que des luciférines et luciférases différentes sont utilisées par les organismes (Wilson

& Hastings, 1998). On dénombre à ce jour 5 familles de luciférines (Campbell, 2012) comprenant 11 luciférines différentes (Lau *et al.*, 2021) alors que la luciférase, elle, est considérée comme spécifique à chaque lignée (Hastings, 1996), la liste des luciférases/photoprotéines étant alors bien plus longue avec pas moins de 134 séquences comptabilisées dans 11 phyla différents (Delroisse *et al.*, 2021). Cette dissemblance de chiffres s'explique notamment par le fait que deux des luciférines, la coelentérazine et la varguline, sont connues pour être acquises par voie alimentaire (Lau *et al.*, 2021) alors que la luciférase est systématiquement synthétisée par l'organisme, à une exception près : chez le poisson *Parapriacanthus ransonnetti* (Steindachner, 1870), la luciférine mais aussi la luciférase sont obtenues via la capture d'ostracodes bioluminescents (Bessho-Uehara *et al.*, 2020). Hormis les divergences de composition chimique des agents de la réaction, d'autres variations sont connues. Que ce soit dans le cas d'une réaction utilisant une luciférase ou une photoprotéine, la réaction peut requérir la présence de cofacteurs tels que de l'ATP ou des cations, comme le  $\text{Ca}^{2+}$ , le  $\text{Mg}^{2+}$  ou le  $\text{Cu}^{2+}$  (Campbell & Herring, 1990), capables de produire un changement de conformation de la protéine.

### 1.3.2.2 Nature de la lumière

La nature de la lumière émise diffère également selon les organismes. Les couleurs observées s'étendent du bleu jusqu'au rouge, avec une prédominance pour le bleu et le vert en milieu marin. Cela s'explique par le fait que ces longueurs d'onde se propagent plus efficacement dans cet environnement (Haddock *et al.*, 2010 ; Widder, 2010). La nature de la lumière dépend notamment de la composition chimique des agents de la réaction lumineuse. Ainsi, quelques différences dans la suite d'acides aminés de la luciférase peuvent modifier la couleur de la lumière émise (Wilson & Hastings, 1998).

Notons cependant que la longueur d'onde de lumière émise ne correspond pas toujours à l'énergie libérée par la molécule excitée lors de la réaction lumineuse. Effectivement, on trouve des protéines fluorescentes, colocalisées avec les composés bioluminescents. Celles-ci sont excitées par l'énergie émise lors de la réaction lumineuse, et réémettent un photon de longueur d'onde correspondant à leur propre fluorescence (Wilson & Hastings, 1998). Un exemple bien connu est le cas de la GFP (protéine fluorescente verte) chez la méduse *Aequorea* où la réaction d'oxydation de la luciférine par la luciférase mène à une émission de lumière bleue ( $\lambda_{\text{max}} \approx 480 \text{ nm}$ ), alors que la lumière observée est plutôt verte ( $\lambda_{\text{max}} \approx 509 \text{ nm}$ ). Cette différence de couleur est expliquée par la présence de la GFP (Wilson & Hastings, 1998).

### **1.3.2.3 Sources de bioluminescence**

La source de l'émission de lumière peut également varier. Elle peut être autogène ou bactériogène. Dans le premier cas la bioluminescence est intrinsèque et produite par l'organisme lui-même, alors que dans le second cas, elle provient de symbiotes bioluminescents (Lau *et al.*, 2021). Selon la fonction que représente la bioluminescence pour l'organisme, celle-ci peut se manifester de deux manières : elle peut être interne, ou se présenter sous forme de sécrétions dans le milieu extérieur (Lau *et al.*, 2021).

### **1.3.2.4 Organes et cellules lumineux**

Les organes bioluminescents rencontrés diffèrent selon les organismes. Cependant, il est possible d'identifier des structures-types définies comme lieux d'émission de la lumière. De manière générale, les cellules au sein desquelles la réaction photogène a lieu sont appelées les photocytes. Elles peuvent se distribuer de manière éparsée dans le corps de l'animal ou se regrouper et former des tissus bioluminescents spécialisés. Ensuite, chez certaines espèces, ces photocytes ou tissus sont accompagnés de structures auxiliaires destinées à réguler et modifier la bioluminescence et formant ce qu'on appelle un photophore. Ces composants accessoires jouent sur des paramètres optiques comme la réflexion et la réfraction notamment (Widder, 2010).

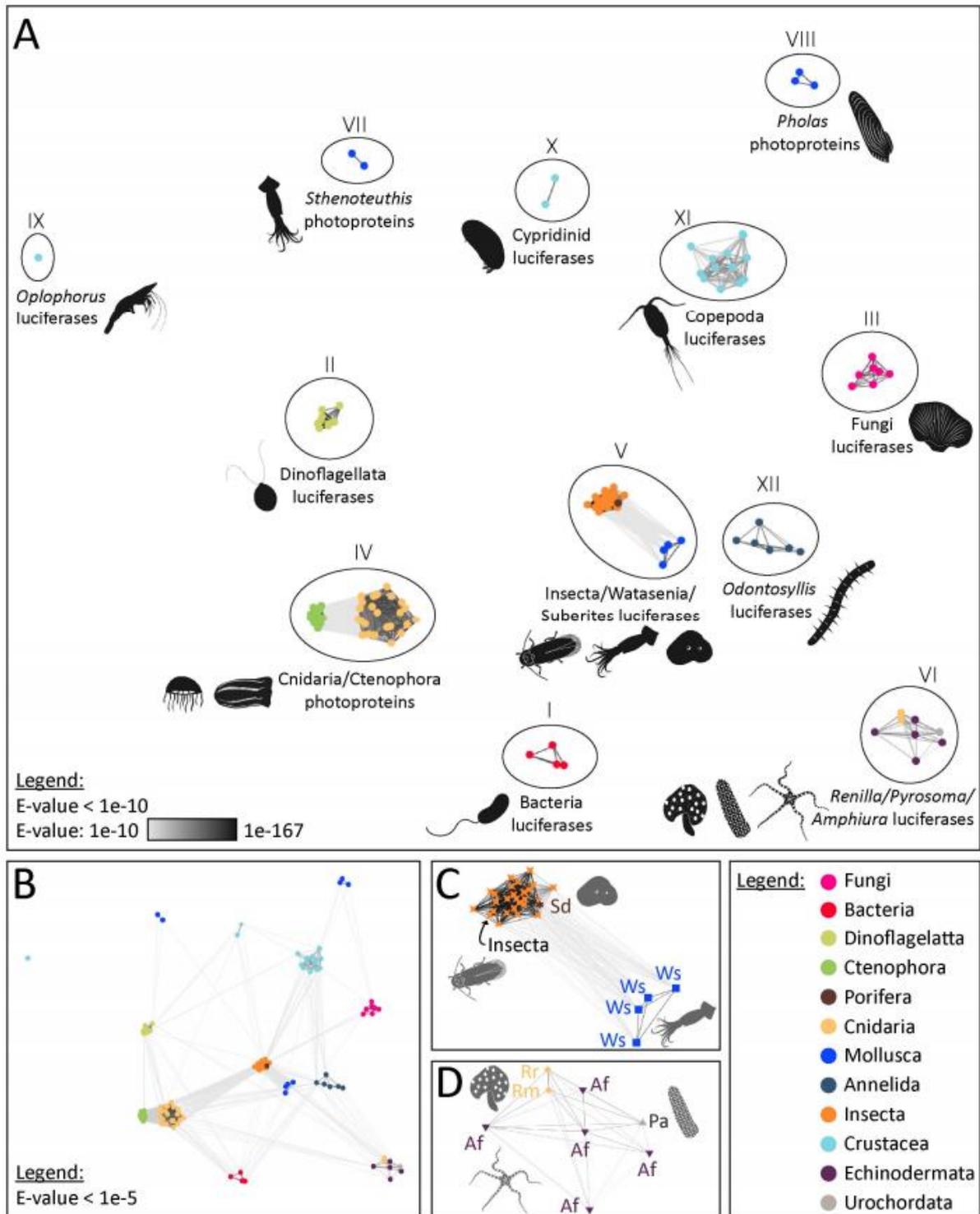
On observe à travers ces descriptions une grande diversité liée à la bioluminescence. Cette diversité remarquable et la répartition décousue de la bioluminescence à travers l'arbre de la vie sont deux facteurs montrant l'importance écologique que représente ce caractère.

## **1.4 Bioluminescence et évolution**

### **1.4.1 Convergence évolutive**

L'importante diversité d'organismes lumineux s'explique notamment par la multitude d'origines évolutives comptabilisées pour ce phénomène biologique. Effectivement, on estime jusqu'à 94 origines indépendantes de la bioluminescence à travers l'arbre de la vie, ce qui fait de la bioluminescence un cas très étudié de convergence évolutive (Lau *et al.*, 2021).

La convergence évolutive, ou évolution convergente, se définit comme un processus évolutif conduisant à l'émergence indépendante de caractères similaires (p. ex., structures, aptitudes,...) au sein de lignées évolutives différentes, et potentiellement d'organismes éloignés phylogénétiquement. Ce processus a lieu soit via des procédés génétiques sous-jacents différents, soit via des mécanismes moléculaires identiques, on parlera à ce moment d'évolution parallèle (Rosenblum *et al.*, 2014).



**Figure 1.4 :** Représentation de la similarité des protéines bioluminescentes (A) Analyse de clustering réalisée avec le logiciel CLANS sur base des e-values des analyses de BLASTp (seuil de e-value :  $1e^{-10}$ ). (B) Analyse identique avec un seuil de e-value de  $1e^{-5}$ . (C) Focus sur le groupe V (seuil e-value :  $1e^{-10}$ ). (D) Focus sur le groupe VI (seuil de e-value :  $1e^{-10}$ ) (Delroisse *et al.* 2021).

L'étude de la convergence évolutive de la bioluminescence n'est cependant pas aisée car la bioluminescence est un trait complexe, régi par de nombreux gènes et structures différents. De plus, la convergence s'applique généralement à un niveau à la fois (Lau *et al.*, 2021). Pour ces raisons, l'étude de la convergence évolutive de la bioluminescence est actuellement envisagée comme une étude multi-niveaux, à travers laquelle on raisonne de manière hiérarchique en considérant le phénomène à différentes échelles (phénotype, organe, cellule, microsources, molécule) (Lau *et al.*, 2021). A cet égard, la génétique et les horloges moléculaires deviennent des outils indispensables pour élucider ces questions évolutives (Lau *et al.*, 2021).

### **1.4.2 Evolution des luciférases**

Parmi les questions posées sur la bioluminescence au sein de la communauté scientifique, l'histoire évolutive des luciférases reste énigmatique. Comme dit précédemment, la diversité des luciférases est bien plus importante que celle des luciférines, puisqu'on estime que les luciférases/photoprotéines sont généralement non homologues entre les différentes lignées (Hastings, 1996), il existe donc presque autant de luciférases et photoprotéines qu'il n'existe de taxa bioluminescents. Cela fait du cas des luciférases un exemple d'évolution convergente intéressant. Mais alors que les luciférases sont connues pour être spécifiques à une lignée, plusieurs études montrent une similarité frappante entre des luciférases ou photoprotéines appartenant à des groupes éloignés phylogénétiquement (Gimenez *et al.*, 2016 ; Delroisse *et al.*, 2017a; Delroisse *et al.*, 2021 ; Müller *et al.*, 2008). Ainsi, Delroisse *et al.* (2021) ont mis en évidence 12 groupes de protéines homologues trouvées chez des organismes pourtant non-apparentés (**Fig.1.4**).

Un des groupes formé rassemble des luciférases d'insectes, de mollusque et d'éponge, bien que le cas de l'éponge reste hypothétique (Gimenez *et al.*, 2016 ; Müller *et al.*, 2008) (**Fig.1.4C**). Les études à ce sujet suggèrent qu'il s'agit d'un cas d'évolution moléculaire parallèle entre les trois lignées, l'évolution moléculaire parallèle est définie comme un cas particulier de convergence évolutive où des phénotypes similaires peuvent être associés à une "réutilisation indépendante" de gènes/protéines homologues (Rosenblum *et al.*, 2014). Dans ce cas précis, les gènes homologues de ligases acyl-CoA, auraient été cooptés indépendamment en gènes de luciférase dans les trois groupes (c.à.d., shift fonctionnel). Cet évènement de cooptation a été uniquement démontré chez les insectes jusqu'à présent (Viviani, 2002).

On retrouve également une similarité élevée entre la luciférase des échinodermes, des cnidaires, et d'un urochordé (**Fig.1.4.D**), précisément chez les organismes *Amphiura filiformis*, *Renilla reniformis* et *Pyrosoma atlanticum*, des hypothèses s'inscrivent alors dans le même sens pour ces trois groupes. On suspecte une évolution moléculaire parallèle avec cooptation de gènes à fonction ancestrale "non-luciférasique". Dans ce cas, en plus d'être similaires entre elles, ces luciférases partagent une similarité importante avec les haloalkane déhalogénases des bactéries (Delroisse *et al.*, 2017a; Nagata *et al.*, 1999), des protéines impliquées dans l'hydrolyse des composés halogénés (Chaloupkova *et al.*, 2019). Ce scénario laisse présager un possible transfert horizontal de gènes entre les bactéries et ces groupes métazoaires et supporte l'hypothèse selon laquelle dans ces deux lignées, les haloalkanes déhalogénases auraient été cooptées en luciférases suivant un procédé d'évolution parallèle (Delroisse *et al.*, 2017a) à l'image des luciférases des insectes, mollusques et éponges. Cela soulève une multitude de questions sur l'évolution des luciférases, précédemment considérées comme spécifiques à chaque lignée (Hastings, 1996).

Cette approche remet donc en question le caractère « non-homologues » des luciférases dans l'évolution de la bioluminescence et, par conséquent, propose une nouvelle réflexion sur l'hypothèse la plus communément acceptée concernant l'origine de la bioluminescence.

Cette hypothèse étant que la bioluminescence serait apparue à la suite d'une période durant laquelle le taux d'oxygène dans l'atmosphère a drastiquement augmenté. En effet, il a été montré que la luciférine, et en particulier la coelentérazine, réagissait facilement avec les dérivés de l'oxygène, suggérant que la fonction ancestrale de la coelentérazine était d'agir comme agent antioxydant puissant en dégradant les dérivés de l'oxygène (Rees *et al.*, 1998). On considère que les enzymes capables de transformer l'énergie chimique de la réaction d'oxydation en énergie lumineuse, comme la luciférase, pourraient avoir été sélectionnées (Wilson & Hastings, 1998). Il est donc proposé qu'une fois que le taux d'oxygène atmosphérique a diminué ou que les organismes ont exploité des zones plus profondes moins oxygénées, la fonction antioxydante de la coelentérazine a pu basculer vers la fonction de bioluminescence de manière durable (Rees *et al.*, 1998). Précédemment, ces informations ont été interprétées comme l'origine de la bioluminescence actuelle mais aujourd'hui, ce qui ressort de ces données est la flexibilité de la coelentérazine à produire de la bioluminescence en jouant de son caractère antioxydant. Ainsi, il semble assez facile de faire apparaître la bioluminescence pour un organisme qui possède déjà un des deux réactifs, puisque la luciférine est largement distribuée dans les organismes, même non bioluminescents, de par son acquisition alimentaire

(Haddock *et al.*, 2010 ; Rees *et al.*, 1998). De plus, les constats précédents montrent que l'apparition de la luciférase pourrait également provenir d'évènements de cooptation de gènes. Le tout encourage l'hypothèse d'origines multiples de la bioluminescence à travers les temps géologiques, avec la luciférine comme foyer évolutif.

## **1.5 Bioluminescence chez les échinodermes**

### **1.5.1 Echinodermes**

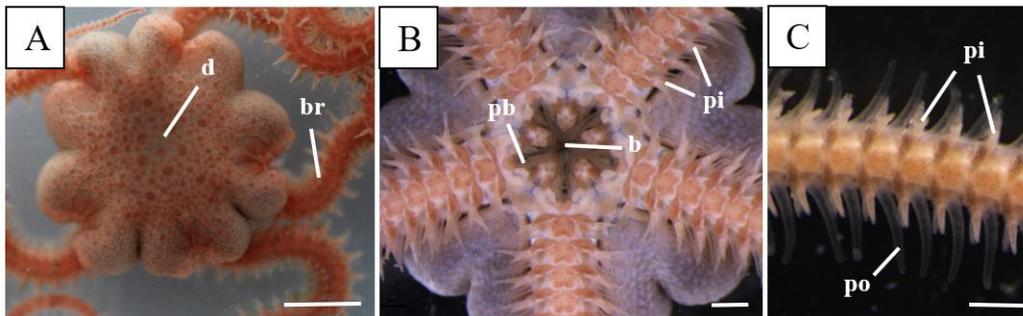
Au sein des 17 phyla contenant des espèces bioluminescentes, les échinodermes sont relativement bien représentés puisque 4 des 5 classes (Asteroidea, Ophiuroidea, Crinoidea, Holothuroidea) les composant possèdent des espèces lumineuses, amenant le nombre d'espèces bioluminescentes déjà décrites à 121 pour cet embranchement (Mallefet *et al.*, 2009). Au sein des 121 espèces, plus de la moitié appartient à la classe des ophiures (en raison notamment d'un effort d'échantillonnage grandissant pour ce groupe). En plus de trouver une proportion relativement élevée d'espèces lumineuses dans cet embranchement, différents systèmes bioluminescents ont été identifiés tant entre les classes qu'au sein de chacune d'entre elles, ce qui indique également des origines indépendantes de la bioluminescence au sein d'une même classe.

### **1.5.2 Ophiures**

Les ophiures (Ophiuroidea) représentent la classe d'échinodermes la plus importante en termes de richesse taxonomique : 2064 espèces et 16 familles sont connues à ce jour (Stöhr *et al.*, 2012). Cette diversité est associée à une répartition géographique large, allant des zones tempérées voire polaires aux régions subtropicales (Mallefet *et al.*, 2009 ; Stöhr *et al.*, 2012). Ces espèces ont également été recensées dans des milieux variés, allant de la zone intertidale aux profondeurs océaniques, jusqu'à la zone hadale (Stöhr *et al.*, 2012).

Les ophiures sont des organismes de petite taille vivant enfouis dans des anfractuosités ou directement dans le sédiment (Stöhr *et al.*, 2012). Au niveau morphologique, celles-ci possèdent au minimum 5 bras relativement frêles reliés à un disque central, de l'ordre de 3 mm à 50 mm de diamètre, qui abrite l'ensemble des organes vitaux (Stöhr *et al.*, 2012 ; **Fig.1.5A-B**). Les bras sont constitués d'une suite de segments formés par des pièces squelettiques et une vertèbre interne (Brusca *et al.*, 2016) (**Fig.1.5C**). Chaque segment porte des podia, appelés aussi pieds ambulacraires, positionnés du côté oral et dont les rôles sont principalement le déplacement et la prise de nourriture (Buchanan, 1964) (**Fig.1.5.C**). Chaque segment porte également des piquants, articulés sur les faces latérales (Mortensen, 1977) (**Fig.1.5.B**). Ces

piquants sont, pour les espèces lumineuses, l'une des principales structures produisant de la lumière (Brehm & Morin, 1977 ; Delroisse *et al.*, 2017b ; Mallefet, 2009).



**Figure 1.5 :** Anatomie externe de différentes ophiures. (A)*Amphiura chiajei* face aborale (Echelle : 5mm) (B) *A.chiajei* face orale (Echelle : 1mm) (C) Bras d'*A.filiformis* face orale. (Echelle : 1 mm). \*Légende : b-bouche ; br-bras ; d-disque ; pb-podia bucaux ; pi-piquant ; po-podion\*.

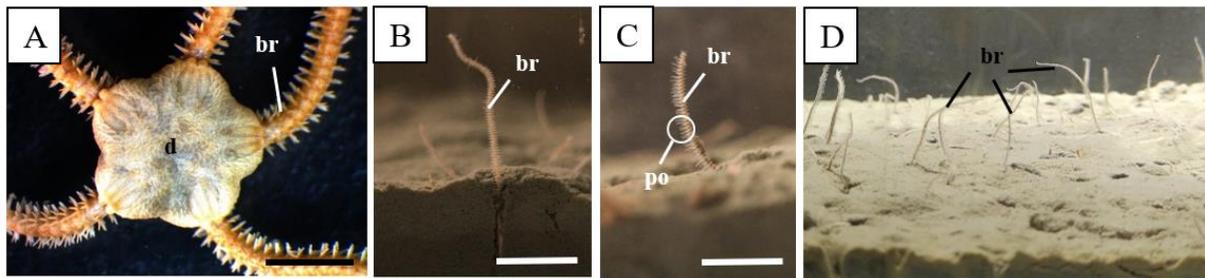
### **1.5.3 *Amphiura filiformis*, une espèce modèle émergente**

Dans le cadre de ce mémoire, les recherches ont principalement été menées sur *Amphiura filiformis*, une espèce d'ophiure modèle et lumineuse, pour laquelle de nombreuses études, notamment sur la perception de la lumière et la régénération, ont déjà été menées.

#### **1.5.3.1 *Amphiura filiformis***

*A. filiformis* (**Fig.1.6**) est une espèce d'ophiure européenne dont l'aire de répartition s'étend de la Mer du Nord à la Mer Méditerranée. Elle se retrouve jusqu'à une profondeur de 200 mètres (Rosenberg et Lundberg, 2004) et vit dans le sédiment vaseux. La plus grande partie de son corps étant enfoui dans la vase à environ 5 cm dans un terrier semi-permanent (Solan & Kennedy, 2002), son observation est uniquement rendue possible grâce à quelques-uns de ses bras, souvent au nombre de deux (Woodley, 1975), qu'elle laisse onduler dans la colonne d'eau (Loo *et al.*, 1996) (**Fig.1.6B-D**). Ceux-ci jouent un rôle dans la capture de nourriture, mais aussi dans la perception de l'environnement, notamment des courants, des signaux chimiques et, des signaux lumineux (Delroisse *et al.*, 2014 ; Loo *et al.*, 1996 ; Rosenberg & Lundberg, 2004). *A. filiformis* se nourrit principalement de particules en suspension mais peut s'adonner à un régime dépositivore selon les conditions environnementales (Buchanan, 1964 ; Loo *et al.*, 1996). En l'occurrence, des expériences (Buchanan, 1964, Loo *et al.*, 1996; observations personnelles) ont révélé un changement de mode d'alimentation selon le courant, une diminution du courant sous les 0,5 cm/s réduisant considérablement l'étendue des bras dans la colonne d'eau.

La prise de nourriture, et donc la libération des bras dans la colonne d'eau concorde avec la photopériode et est considérablement plus intense durant la nuit (Rosenberg & Lundberg, 2004).



**Figure 1.6 :** Description de l'espèce *A. filiformis* et de son mode de vie. (A) Anatomie externe d'*A. filiformis* face aborale (Echelle : 0,5 cm). (B-D) Bras d'*A. filiformis* sortant du sédiment (Echelle B-C : 1 cm). (C) Bras d'*A. filiformis* étendant ses podia pour l'alimentation. \*Légende : br-bras ; d-disque ; po-podia\*.

### 1.5.3.2 Bioluminescence chez *Amphiura filiformis*

Il est proposé que la fonction biologique de la bioluminescence chez *A. filiformis* est liée à une stratégie anti-prédation, comme cela a été montré chez *Ophiopsila riisei* et *Amphipholis squamata* (Deheyn *et al.*, 2000 ; Grober, 1988). Chez de nombreuses espèces, la production de lumière peut constituer un signal aposématique, c'est-à-dire un signal indiquant le danger pour dissuader le prédateur (Grober, 1988 ; Mallefet, 2009) ou représenter une source de distraction.

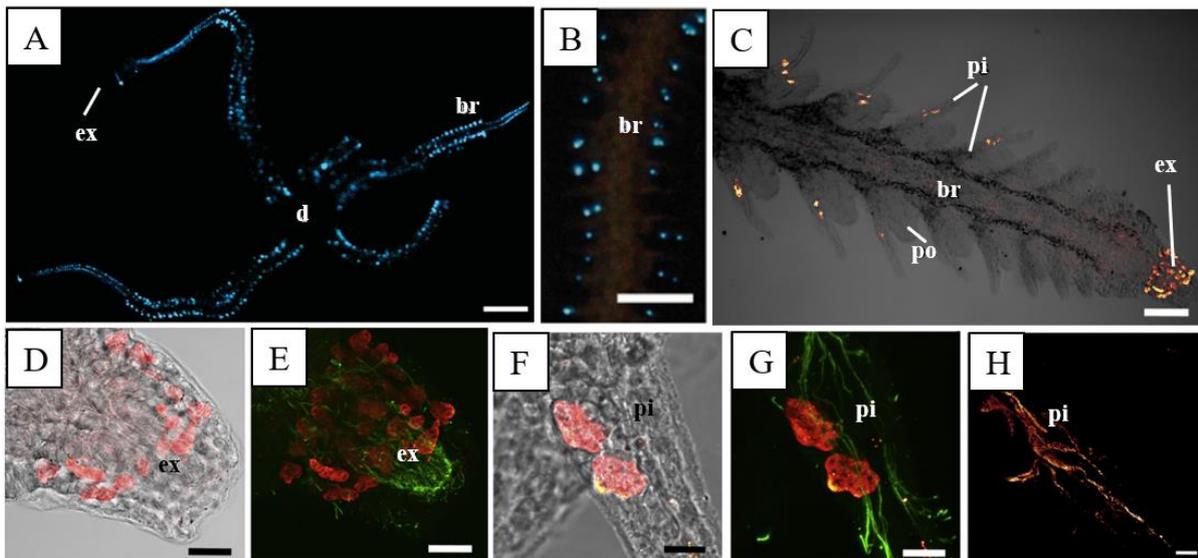
En plus de cela, les capacités d'autotomie des bras relevées chez *A. filiformis* suggèrent que, la bioluminescence pourrait jouer un rôle dans un système de leurre lumineux sacrificiel, comme cela a été démontré pour l'espèce *Amphipholis squamata* (Deheyn *et al.*, 2000). Au cours de ce processus, l'individu attaqué abandonnerait par autotomie une partie du membre touché, celui-ci maintenant la bioluminescence même après la lésion alors que le reste du corps demeure non bioluminescent. Cette stratégie lui permettrait de sacrifier une partie de son corps en faveur de sa survie.

De plus, *A. filiformis* est connue pour ses facultés de régénération des bras, comme c'est le cas pour de nombreuses espèces d'échinodermes (Czarkwiani *et al.*, 2016). Chez cette espèce, la vitesse de régénération est comprise entre 0,08 et 0,45 mm par jour, et on estime que quelques jours suffisent pour que les tissus fonctionnels soient restaurés (Dupont & Thorndyke, 2006). En moyenne, 84% des individus présentent des cicatrices dues à un événement d'autotomie (Sköld et Rosenberg, 1996). Il a également été montré que le taux de régénération est plus important chez les espèces d'ophiures suspensivores plutôt que chez les espèces carnivores ou détritivores qui se nourrissent sur le benthos (Sköld & Rosenberg, 1996),

indiquant que le comportement alimentaire de ces espèces suspensivores présente des dangers considérables. Cette vulnérabilité engendrée par le mode de nutrition (Buchanan, 1964), les capacités d'autotomie des bras et de régénération rapide de ceux-ci semblent conforter l'hypothèse du leurre lumineux sacrificiel pour cette espèce.

La lumière émise par *A. filiformis* est une lumière bleue, avec un pic d'émission à une longueur d'onde de 472 nm (Delroisse *et al.*, 2017a). Avec *Ophiomusium lymani*, *A. filiformis* est la seule espèce lumineuse connue produisant de la lumière bleue (Delroisse *et al.*, 2017a ; Mallefet, 2009), la lumière émise la plupart du temps se trouvant plutôt dans la gamme du vert (Widder *et al.*, 1983). La bioluminescence chez *A. filiformis* a pour origine une réaction impliquant la coelentérazine comme luciférine, acquise par voie alimentaire (Mallefet *et al.*, 2020), et une luciférase, semblable à celle produite par *Renilla reniformis* et synthétisée par l'ophiure.

Concernant l'organisation des tissus lumineux, la bioluminescence chez *A. filiformis* se manifeste dans deux régions distinctes : au niveau des piquants portés par chaque segment de bras de l'ophiure, et au niveau de l'extrémité distale de chaque bras, où l'intensité lumineuse est particulièrement soutenue (Delroisse *et al.*, 2017b, **Fig.1.7A-B**).



**Figure 1.7 :** Caractéristiques de la bioluminescence d'*A. filiformis*. (A) Emission de lumière sous stimulation au KCl (Echelle : 0,5 cm). (B) Focus sur un bras d'*A. filiformis* stimulé au KCl (Echelle : 1mm). (C) Immunodétection de la luciférase dans le bras d'*A. filiformis* avec l'anticorps Anti-Rluc A (Echelle : 100 µm). (D-E) Immunodétection de la luciférase à l'extrémité du bras d'*A. filiformis* avec l'anticorps Anti-Luc A (Echelle : 20 µm). (F-G) Immunodétection de la luciférase dans le piquant du bras d'*A. filiformis* avec l'anticorps Anti-Luc A (Echelle : 20 µm). (H) Immunodétection de la luciférase dans le piquant du bras d'*A. filiformis* avec l'anticorps Anti-Luc C (Echelle : 10 µm). (A-B) Delroisse *et al.*2017a (C-H) Delroisse *et al.*2017b. \*Légende : br-bras ; d-disque ; ex-extrémité du bras ; pi-piquant ; po-podion\*.

En ce qui concerne les piquants, chez *A. filiformis*, les piquants se situent sur les faces latérales de chacun des segments et sont au nombre de 3 à 6 paires par segment. L'émission de lumière apparaît à l'extrémité de ceux-ci (**Fig.1.7B**), ce qui est une particularité chez les ophiures, chez qui la lumière est généralement émise à la base des piquants (Mallefet, 2009). Afin de mieux comprendre le système d'émission de lumière chez *A. filiformis*, des analyses approfondies visant à localiser les photocytes dans le corps de l'ophiure ont été menées par Delroisse *et al.*(2017b). La localisation de la luciférase, la protéine synthétisée par l'organisme et responsable avec d'autres composés de la réaction lumineuse, est un bon indicateur du lieu de réaction, donc des photocytes. L'utilisation d'anticorps orientés contre la luciférase ont alors permis de situer ces cellules, les résultats ont révélé la présence d'un grand nombre de photocytes concentrés à l'extrémité du bras (**Fig.1.7C-E**) et des photocytes isolés situés au niveau basal de chaque piquant (Delroisse *et al.*, 2017b ; **Fig.1.7C,F-G**). Cette dernière observation est inattendue compte tenu du fait que la bioluminescence est visible précisément à l'extrémité des piquants et non à la base de ceux-ci (**Fig.1.7A-B**). De plus, les recherches ont montré un marquage de la luciférase au niveau du piquant particulier : un marquage localisé à la base du piquant mais aussi un marquage continu et longiligne traversant le piquant dans sa longueur (**Fig.1.7H**).

Alors que certains organismes présentent une bioluminescence continue, d'autres émettent de la lumière à des moments précis, souvent sous forme de flashes (Wilson & Hastings, 1998). Ces deux systèmes demandent un contrôle de la lumière émise. Comme pour la bioluminescence de manière générale, une certaine diversité de processus de contrôle existe. Dans le cas d'*A. filiformis*, on pense que la bioluminescence a une fonction anti-prédatrice, et qu'elle est émise dans un contexte d'attaque par un prédateur, ce qui signifie que le signal lumineux serait émis rapidement après le contact et constitue une réponse rapide à un stimulus. La proximité entre les photocytes et le plexus nerveux (Delroisse *et al.*, 2017b) ainsi qu'une série de tests pharmacologiques impliquant l'inactivation de neurotransmetteurs et de neuromodulateurs (Dewael & Mallefet, 2002; Vanderlinden & Mallefet, 2004) encouragent l'hypothèse selon laquelle la bioluminescence est sous contrôle nerveux, comme c'est le cas pour la plupart des ophiures (Mallefet, 2009).

## **1.6 Objectifs**

Ce mémoire avait pour objectif général d’obtenir une meilleure compréhension de l’évolution de la bioluminescence et du système de production de lumière chez l’ophiure modèle *Amphiura filiformis*.

Plus spécifiquement, deux axes ont été envisagés :

### **1.6.1 Émergence évolutive de la bioluminescence chez *A. filiformis***

La similitude mise en évidence entre les luciférase d’*A. filiformis* et de *Renilla reniformis*, des organismes pourtant éloignés phylogénétiquement, ainsi que la similarité entre ces deux luciférase et des enzymes bactériennes ayant une fonction haloalkane déhalogénase, soulèvent des questions quant à l’évolution de ces luciférase dans le monde du vivant.

Dans ce contexte, mon travail avait pour but d’élucider ces questions et de vérifier les hypothèses évolutives précédemment émises sur l’évolution de la luciférase de *Renilla* à travers l’arbre de la vie, et en particulier chez les échinodermes et les cnidaires.

### **1.6.2 Système bioluminescent chez *A. filiformis***

La bioluminescence chez *Amphiura filiformis* a été largement étudiée et de nombreuses informations, allant de la nature de la lumière émise au contrôle de la bioluminescence sont connues. Cependant, des zones d’ombre subsistent en ce qui concerne certaines facettes du système bioluminescent de l’ophiure. En particulier, le processus cellulaire de la bioluminescence n’est pas totalement élucidé et les recherches récentes ont révélé deux “patrons d’expression” différents de la luciférase sans qu’aucune explication biologique satisfaisante ne soit disponible (Delroisse *et al.*, 2017b). Ainsi, des analyses supplémentaires sur l’expression de la luciférase étaient nécessaires afin d’obtenir une meilleure compréhension de l’organisation des cellules photogènes au niveau du piquant, et ce, dans des conditions d’émission de lumière ou d’absence d’émission.

Cet axe du mémoire avait alors pour objectifs de caractériser l’expression de la luciférase au sein des tissus de l’ophiure - en particulier les piquants qui émettent la lumière - ainsi que de décrire la dynamique de l’expression de la luciférase au cours de la réaction de bioluminescence.

# 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

## 2.1 Analyse in silico

### 2.1.1 Avant-propos

#### 2.1.1.1 Constats

1. La luciférase de *Renilla reniformis* (Cnidaria) et d'*A. filiformis* (Echinodermata) partagent une similarité élevée, or ces espèces sont phylogénétiquement éloignées (Delroisse *et al.*, 2017a).
2. La luciférase de *R. reniformis* partage une similarité élevée avec les haloalkane déhalogénases des bactéries (Delroisse *et al.*, 2017a). De plus, les sites actifs de la luciférase de *R. reniformis* et des haloalkane déhalogénases bactériennes sont identiques (Woo *et al.*, 2008 ; Chaloupkova *et al.*, 2019).
3. Une protéine homologue ayant une fonction haloalkane déhalogénase a également été identifiée chez l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* (Echinodermata) (Fortova *et al.*, 2013).

Cette distribution éparse des protéines/gènes homologues à la luciférase de *R. reniformis* et aux haloalkane déhalogénases bactériennes laisse présager une histoire évolutive complexe de ces enzymes.

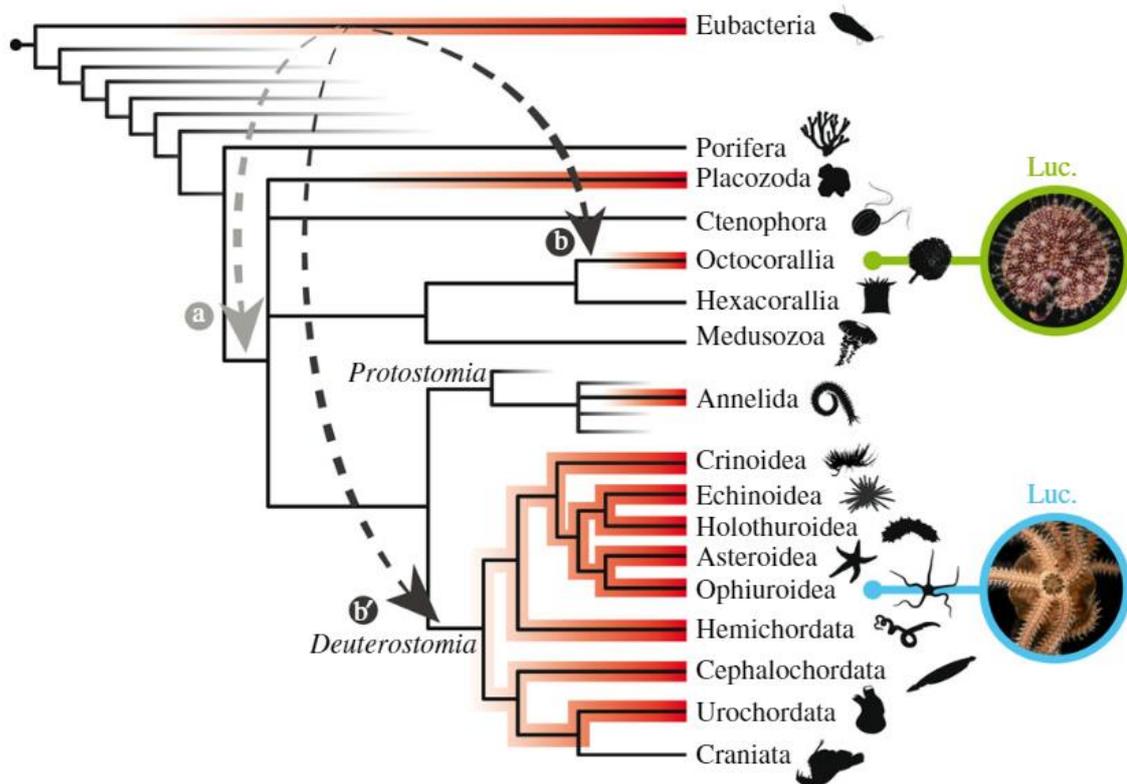
Pour plus de fluidité et pour une meilleure compréhension, l'abréviation RLuc sera utilisée dans la suite du mémoire pour désigner les protéines homologues à la luciférase de *Renilla*. De même, l'abréviation HD représentera les haloalkanes déhalogénases et le terme "homologues Rluc/HD" désignera les séquences homologues à la luciférase de *Renilla* et aux haloalkane déhalogénases.

#### 2.1.1.2 Hypothèses

La présence d'enzymes similaires chez des organismes phylogénétiquement éloignés ayant divergé depuis environ 500 millions d'années (Loening *et al.*, 2006), ainsi que l'absence de cette enzyme dans d'autres groupes métazoaires soutiennent l'hypothèse d'un transfert horizontal de gènes. Une série d'hypothèses sur le moment du transfert horizontal et le groupe taxonomique impliqué ont déjà été émises par Delroisse *et al.*, 2017a (**Fig.2.1**) et comprend :

- a) un transfert horizontal de gènes chez l'ancêtre commun des échinodermes et des cnidaires; b

et b') des transferts horizontaux multiples à partir des bactéries vers différents groupes métazoaires; c) un transfert horizontal des bactéries vers un groupe métazoaire et transfert horizontal secondaire d'un métazoaire à un autre métazoaire (non représenté en **Fig.2.1**).



**Figure 2.1 :** Distribution des protéines homologues Rluc/HD chez les métazoaires et les bactéries et hypothèses évolutives. \*La présence de protéines homologues Rluc/HD est indiquée par une coloration rouge. Les flèches représentent les hypothèses de transfert horizontal de gènes (Delroisse *et al.*, 2017a).\*

De plus, la similarité entre les séquences de HD et de RLuc appuie l'idée selon laquelle la luciférase pourrait être apparue à la suite d'un événement de cooptation à partir d'une haloalkane déhalogénase (Delroisse *et al.*, 2017a). Il est suggéré que ce processus aurait eu lieu -en parallèle- dans la lignée des échinodermes et dans celle des cnidaires, et ce de manière convergente.

### 2.1.1.3 Objectif et méthodologie

La présente étude a pour objectif de clarifier l'histoire évolutive de la luciférase de type RLuc à travers l'arbre du vivant et en particulier au sein des échinodermes et des cnidaires. Pour répondre à ces hypothèses liées au transfert horizontal de gènes et à la cooptation, plusieurs méthodes ont été utilisées.

Dans un premier temps, l'objectif était d'avoir une idée précise de la distribution des organismes possédant une ou plusieurs protéine(s) homologue(s) à la luciférase de *Renilla reniformis* dans l'arbre de la vie. Pour ce faire, des recherches de séquences homologues ont été effectuées sur l'ensemble des embranchements métazoaires et chez les bactéries. Les séquences trouvées incluant des séquences d'haloalkane déhalogénases, ces séquences seront ensuite appelées séquences homologues RLuc/HD.

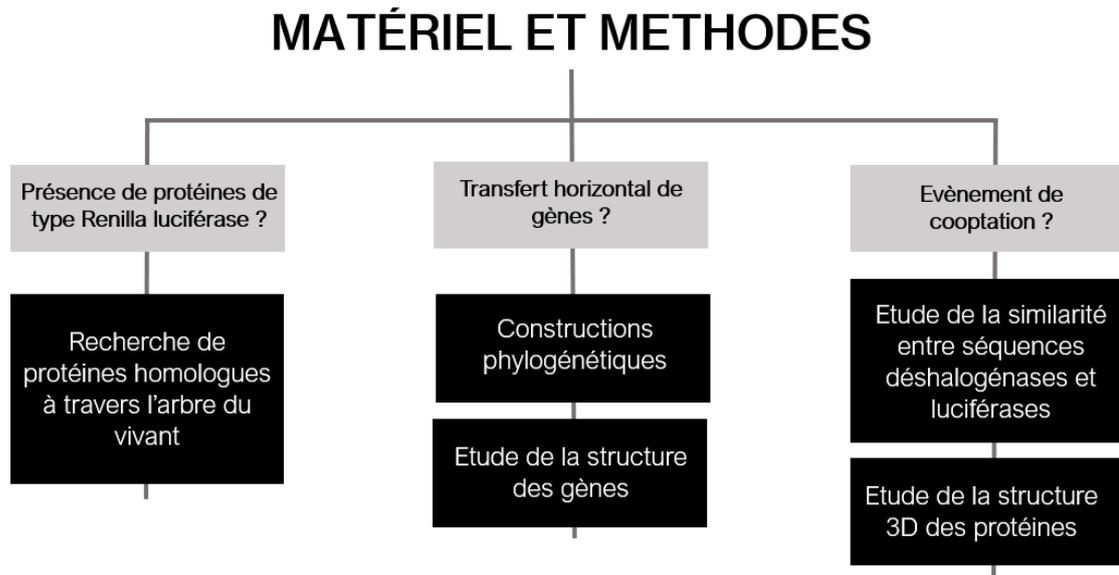
Dans un second temps, des constructions phylogénétiques ont été réalisées à partir des séquences homologues RLuc/HD obtenues au point précédent. Celles-ci ont offert un support visuel et informatif permettant l'élaboration d'hypothèses évolutives en lien avec le transfert horizontal de gènes. De plus, la compréhension de l'histoire évolutive des gènes de luciférase et l'étude d'un potentiel transfert horizontal peut passer par une analyse approfondie de la structure et de l'organisation des gènes homologues RLuc/HD (p. ex., Kuo *et al.*, 2005, Ke *et al.*, 2020). Dès lors, la structure des gènes des différentes espèces a été mise en évidence et détaillée.

Dans un troisième temps, l'étude s'est portée sur l'hypothèse de la cooptation de gènes d'haloalkane déhalogénase en gènes de luciférase. Un événement de cooptation se définit comme l'apparition d'une fonction nouvelle par modification de caractères biologiques déjà existants (True & Carroll, 2002). Dans ce cadre, nous voudrions savoir si une protéine avec une fonction déhalogénase pourrait balancer vers une fonction luciférase.

De plus, la cooptation suit souvent des duplications de gènes (True & Carroll, 2002). Lorsque c'est le cas, les gènes dupliqués, moins soumis initialement aux pressions sélectives, peuvent acquérir de nouvelles fonctions alors que la fonction initiale est conservée par les gènes ancestraux. Un événement de cooptation peut alors être décelé en identifiant la co-occurrence des deux fonctions, la fonction ancestrale et la fonction nouvelle (Delroisse *et al.*, 2021). Pour ce faire, le pourcentage de similarité par rapport à RLuc et par rapport à une protéine de référence HD a été calculé pour les protéines homologues RLuc/HD des échinodermes, des cnidaires et des bactéries afin de mettre éventuellement en évidence la présence de deux clusters de gènes chez une même espèce. Dans la continuité de cette idée, une seconde étude de similarité a été réalisée, celle-ci ne compare pas seulement les protéines à RLuc et à HD mais compare toutes les protéines 2 à 2. Elle a pour but de visualiser comment les protéines homologues RLuc/HD se regroupent entre elles sur base de leur similarité.

Cependant, l'étude de la similarité de séquences ne suffit pas à indiquer une différence fonctionnelle puisque d'une part la similarité générale peut cacher une dissimilarité locale ou inversement et d'autre part, la fonction trouve également son origine dans l'organisation tridimensionnelle de la protéine. Effectivement, le repliement d'une protéine permet notamment de regrouper des acides aminés qui, au sein d'une séquence linéaire, se retrouvent isolés. Ainsi, le site actif d'une protéine est composé d'acides aminés éloignés dans la séquence. Ce site actif est particulièrement important puisqu'il assure la fonction de la protéine. Une seconde manière d'évaluer la fonction des protéines est donc de s'intéresser au site actif de protéines testées fonctionnellement et dont la structure cristallographique a été publiée et de déterminer si les acides aminés le composant sont également présents chez les protéines d'intérêt. Dans ce cas-ci, 6 acides aminés ont été identifiés comme ayant une importance cruciale pour que la protéine soit fonctionnelle. Chez la luciférase comme chez la déhalogénase, il s'agit d'une pentade catalytique (Asp-His-Glu+Trp-Asn) et d'un résidu voisin de Asn (Chaloupkova *et al.*, 2019). Alors que la pentade catalytique a un rôle dans la liaison et la réaction avec le ligand (Woo *et al.*, 2008), le résidu voisin de Asn semble intervenir dans la distinction entre la fonction luciférase et déhalogénase de l'enzyme. Effectivement, il a été montré qu'une enzyme luciférase artificielle (RLuc 8) acquiert une activité hydrolase lorsque l'acide aminé Ala, voisin de Asn, est muté en Pro, et voit son activité luciférase diminuer (Chaloupkova *et al.*, 2019). Une comparaison des séquences des protéines d'intérêt chez *A. filiformis* et des protéines testées biochimiquement et dont la structure cristallographique est disponible (RLuc8, HD) a donc été exécutée afin d'évaluer la conservation de ces résidus et de déterminer si le voisin de Asn est plutôt Ala ou Pro. Pour finir, des modèles 3D des protéines RLuc-homologues chez *A. filiformis* ont été générés sur base des structures cristallographiques de RLuc8 et de HLD afin de voir si ces modèles pouvaient se lier avec la coelenteramide, et donc prétendre à une fonction luciférase.

## 2.1.1.4 Résumé des méthodes utilisées



## 2.1.2 Matériel et méthodes

### 2.1.2.1 Recherche de séquences homologues à Rluc

Des recherches de séquences homologues à la protéine *Renilla* luciférase ont été réalisées à l'aide de l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool ; Altschul *et al.*, 1990) sur l'ensemble des embranchements métazoaires et chez les bactéries. La séquence de référence utilisée était la séquence protéique de luciférase de l'espèce *Renilla reniformis* (GenBank : AAA29804.1), celle-ci étant la seule à avoir été testée biochimiquement pour la production de lumière (Lorenz *et al.*, 1991). Les recherches BLAST ont été exécutées sur l'application en ligne NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ; Federhen, 2012) dans la base de données Nr ("non-redundant protein sequences") pour la majorité des organismes étudiés. Pour *Amphiura filiformis*, la recherche a été effectuée sur un serveur spécifique "SequenceServer" (Priyam *et al.*, 2019). Pour certains cnidaires (*T.musica*, *S.cruciata*, *P.flava*, *R.muelleri*), les données ont été collectées à partir de l'article de Bessho-Uehara *et al.*, 2020 et la recherche BLAST a été réalisée à l'aide du programme BioEdit (v.7.2.5 ; Hall, 1999; Hall, 2011). Les analyses ont été menées en BLASTp ou en tBLASTn selon que les données pour l'espèce fournissent le protéome ou le génome, respectivement. Les séquences ont été considérées comme "homologues" lorsque la e-value obtenue après recherche BLAST était inférieure à  $10e^{-10}$ . Pour chaque séquence candidate révélée, un BLAST réciproque (BLASTp) a été effectué sur NCBI afin de confirmer la recherche BLAST. L'ensemble des séquences homologues candidates de

la luciférase de type *Renilla* ainsi que la e-value obtenue par BLAST et BLAST réciproque ont été regroupés dans l'**Annexe 1**.

## **2.1.2.2 Transfert horizontal de gènes**

### 2.1.2.2.1 Arbres phylogénétiques

#### A. Sélection des séquences

Les hypothèses émises s'intéressent à un transfert horizontal de gènes de luciférase ou d'haloalkane déhalogénase. Dès lors, les séquences choisies pour constituer cet arbre sont les séquences homologues RLuc/HD connues dans le monde du vivant. Celles-ci ont été collectées au point précédent via une recherche Blast dans NCBI à partir de RLuc (**Annexe 1**). Des séquences supplémentaires homologues RLuc/HD ont été obtenues à partir de l'article de Tessler *et al.*, 2020.

Il s'est avéré que les séquences d'haloalkane déhalogénases candidates étaient présentes chez un nombre important de clades bactériens. Ainsi, les séquences bactériennes sélectionnées sont celles dont la e-value était la plus faible (avec un seuil maximal de  $10e^{-10}$ ), ce qui reprend les séquences fortement semblables à la séquence recherchée. La sélection s'est également portée sur les noms de taxons les plus fréquemment rencontrés et ceux appartenant à des classes suffisamment éloignées phylogénétiquement pour représenter l'ensemble des bactéries.

Ce type de construction phylogénétique demande d'enraciner l'arbre avec une ou plusieurs séquence(s) homologue(s) provenant d'espèces non apparentées. Dans ce cas, les séquences sélectionnées sont celles dont la recherche BLAST avec RLuc ont donné une e-valeur plus grande que  $10e^{-10}$ , ces séquences se sont avérées être des séquences d'époxide-hydrolase.

#### B. Construction d'arbres phylogénétiques

Les arbres phylogénétiques (**Fig.3.1, Fig.3.2**) ont été générés sur le site en ligne PhyML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>; Guindon *et al.*, 2010 ; Guindon & Gascuel, 2003) ou IQ-Tree (<http://www.iqtree.org/>; Chernomor *et al.*, 2016) à partir d'alignements de séquences protéiques "trimés" -c'est-à-dire travaillés pour que les zones d'alignement incertaines soient supprimées- via le site en ligne Phylemon2 (<http://phylemon2.bioinfo.cipf.es/>, TrimAL(v1.3)), et ont été travaillés sur le plan esthétique à l'aide du programme Figtree (v.1.4.4). Les deux premiers arbres ont été générés avec PhyML et le troisième avec IQ-Tree. Dans PhyML, qui se base sur le modèle de maximum de vraisemblance, le modèle de substitution a été sélectionné

via le programme SMS (Smart Model Selection ; Lefort *et al.*, 2017) en suivant le critère d'information d'Akaike (AIC ; Akaike, 1998 ; Lefort *et al.*, 2017). La méthode de distance NNI (Nearest Neighbor Interchange ; Robinson, 1971), a ensuite été utilisée, ainsi que le BIONJ (Gascuel, 1997). La valeur de support de chaque branche a été calculée à partir d'une analyse de 500 répliquats de bootstrap. L'arbre phylogénétique final a été construit avec IQ-Tree. Durant l'analyse, les séquences jugées trop courtes par le programme ont été exclues de la construction phylogénétique, ces séquences pouvant influencer la topologie de l'arbre. Le modèle d'évolution LG+G4 a préalablement été choisi par ModelFinder (implémenté dans IQ-tree) en suivant le critère d'information BIC. L'analyse phylogénétique a ensuite été réalisée et 1000 répliquats de bootstrap ont été réalisés.

#### 2.1.2.2.2 Structure des gènes

La structure des gènes a été mise en évidence pour une partie des gènes homologues RLuc/HD identifiés au point 2.1.2.1 (**Annexe 1**) à l'aide de l'outil « Genome Browser » sur l'application en ligne NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ; Federhen, 2012) et sur "SequenceServer" (Priyam *et al.*, 2019) pour les données concernant *Amphiura filiformis*. A partir de ces données, une représentation schématique de la structure des gènes a été réalisée sur les programmes Illustrator (v2105.0.0) et PowerPoint (v2106). Ces représentations (**Fig.3.3**, **Fig.3.4** (voir **Annexe4**)) permettent de visualiser des paramètres essentiels à la compréhension de l'évolution des gènes homologues RLuc/HD tels que le nombre de gènes, le nombre d'introns, la taille des gènes, le sens des gènes et la position des gènes sur le fragment d'ADN.

### 2.1.2.3 Cooptation

#### 2.1.2.3.1 Similarité de séquences

Des matrices de similarité ont été générées sur le site en ligne SIAS (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>). Les séquences protéiques d'échinodermes, de cnidaires et de bactéries obtenues après recherche Blast/Blast réciproque ont au préalable été alignées sur le serveur en ligne MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). L'alignement fourni a été modifié pour retirer les zones d'incertitude ("triming") via Phylemon2 (<http://phylemon2.bioinfo.cipf.es/>, outil TrimAL(v1.3)) et les alignements "trimés" ont été transférés sur le site SIAS qui a généré une matrice de similarité selon le système matriciel BLOSUM 62.

Cette matrice a servi de base pour l'édition d'un graphique du pourcentage de similarité des enzymes homologues RLuc/HD de chaque espèce par rapport à Rluc (AAA29804.1) et à

une séquence de référence de HD (2qvb.1), réalisé sur R (Rstudio, v1.3.959) (**Fig.3.5, Fig.3.6**). De plus, une analyse CLANS (Frickey & Lupas, 2004) a été réalisée sur base cette matrice, celle-ci compare les séquences 2 à 2 et les relie dans un espace en 3 dimensions (**Fig.3.7**).

#### 2.1.2.3.2 Conservation du site actif et structure 3D des protéines

Les séquences protéiques d'*A. filiformis* utilisées pour l'alignement de séquences et pour la construction de modèles 3D sont des séquences de protéines prédites à partir des gènes de luciférase (AF10707.1, AF37282.1, AF37308.1, AF37332.1, AF17859.1). Les 5 séquences ont été sélectionnées sur base de leur taille, en l'occurrence les séquences de taille similaire à celle de la luciférase de *Renilla reniformis* (AAA29804.1) ont été choisies.

##### A. Alignement de séquences

Un alignement de séquences (**Fig.3.8**) a été réalisé afin de vérifier la conservation des résidus du site actif entre les protéines d'intérêt chez *A. filiformis* et des protéines testées fonctionnellement. Les séquences des enzymes testées biochimiquement ont été obtenues sur NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Federhen, 2012) (RLuc, SpurHLD) et via l'article Tessler *et al.* 2020 (PyroLuc), et les séquences des modèles 3D (Rluc 8, HLD, AnchLD-RLuc) ont été collectées sur le site en ligne Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>, Schwede *et al.*, 2003). L'alignement de séquences a été réalisé à l'aide de l'outil MAFFT disponible en ligne (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>, Katoh *et al.*, 2019) et l'alignement a été édité suivant les paramètres par défaut.

##### B. Etude de la structure 3D des protéines

Des modèles d'homologie 3D ont été réalisés pour les 5 séquences sur base des structures cristallographiques de luciférase (2PSJ, Loening *et al.*, 2007), d'haloalkane déhalogénase (2O2I, Mazumdar *et al.*, 2008), et de l'ancêtre commun hypothétique de celles-ci (6G75, Chaloupkova *et al.*, 2019). Ces modèles ont été réalisés sur le site en ligne Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>, Schwede *et al.*, 2003). Les valeurs de QMEAN et de liaison au ligand sont fournies dans les résultats du modèle et sont regroupées dans le **Tableau 3.1**).

## 2.2 Analyses en laboratoire

### 2.2.1 Collecte des échantillons

Plusieurs lots d'ophiures de l'espèce *Amphiura filiformis* ont été collectés à des moments différents. Un individu de l'espèce *Ophiura albida* a été utilisé comme contrôle en tant que représentant d'une espèce d'ophiure non lumineuse.

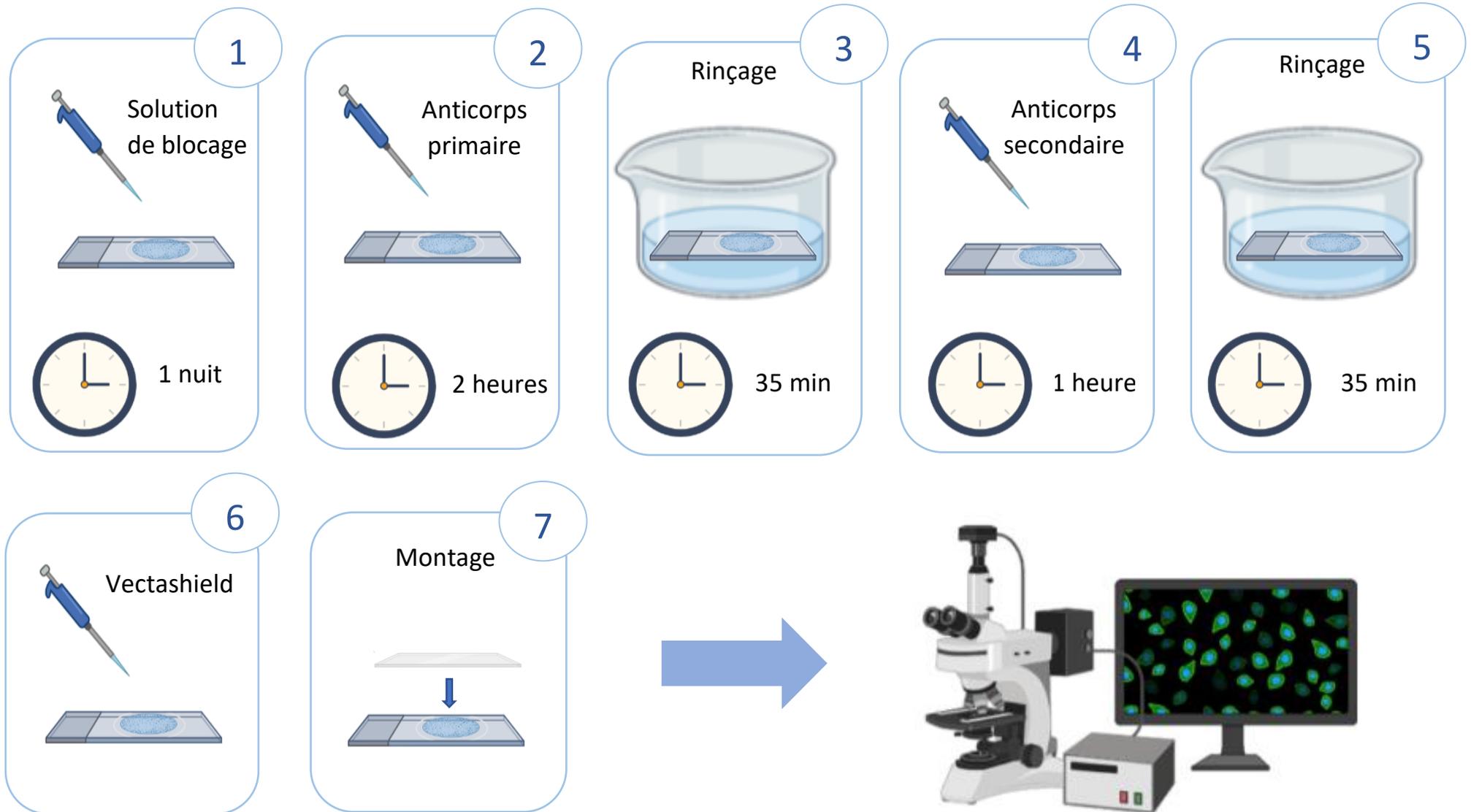
**Tableau 2.1 :** Informations sur les lots d'ophiures collectés pour les expériences.

Lot	Espèce	Lieu de récolte	Date de récolte
Lot 1	<i>Amphiura filiformis</i>	Fjord Gullmar, Kritineberg (Suède)	2017
Lot 2	<i>Amphiura filiformis</i>	Fjord Gullmar, Kritineberg (Suède)	2017
Lot 3	<i>Amphiura filiformis</i>	Fjord Gullmar, Kritineberg (Suède)	Mai 2021
Lot 4	<i>Ophiura albida</i>	Audresselles (France)	2021

### 2.2.2 Réalisation de coupes histologiques

La réalisation de coupes histologiques a été nécessaire pour les analyses en histologie classique et en immunofluorescence (point 2.2.3). En partant de l'organisme entier et pour arriver aux coupes, les étapes suivantes ont été réalisées :

1. Fixation de l'organisme ou du tissu : conserve les tissus et empêche la colonisation bactérienne. Différents types de fixateurs sont employés selon la manipulation à réaliser, dans ce cas, du paraformaldéhyde 4% PBS a été utilisé.
2. Décalcification : élimine les structures calcifiées. La décalcification a été assurée à l'aide d'un mélange équivolument d'acide ascorbique et de NaCl.
3. Enrobage en paraffine : maintient l'organisme dans un bloc de paraffine facilitant la découpe.
4. Découpe des blocs de paraffine et mise sur lame : permet la fixation d'une coupe fine de tissu sur la lame histologique. La découpe a été réalisée à l'aide d'un microtome (Microm HM 340 E), des coupes de 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été faites et déposées sur lame.
5. Déparaffinage : élimine la paraffine ayant permis la fixation des tissus sur la lame histologique. Le déparaffinage des coupes a été assuré via une série de bains de toluène.
6. Coloration au Trichrome de Masson (Gabe, 1968), immunomarquage (point 2.2.3) : mise en évidence des tissus, ou des protéines.



**Figure 2.2 :** Etapes de l'immunofluorescence sur coupe. (Images : Biorender)

### **2.2.3 Immunohistochimie**

Cette technique immunologique appliquée à l'histologie permet de localiser des protéines d'intérêt au sein de tissus, elle est basée sur le principe de reconnaissance entre un anticorps et un antigène. Dans ce cas-ci, l'objectif était de caractériser l'expression de la luciférase dans les tissus de bras chez *Amphiura filiformis*. Cette méthode a été adoptée selon deux procédés : sur le tissu en coupes (point 2.2.3.1) ou sur l'entièreté du tissu (Whole-Mount, point 2.2.3.2).

L'expression de la luciférase peut être étudiée à différents moments. En l'occurrence, ces expériences ont dans un premier temps été réalisées sur des organismes fixés sans qu'il y ait eu émission de lumière et dans un deuxième temps sur des organismes dont la bioluminescence a été provoquée chimiquement avant la fixation. Cette deuxième condition visait à étudier la dynamique d'expression de la luciférase.

#### **2.2.3.1 Immunofluorescences sur coupe**

Cette technique se réalise sur lames histologiques préalablement déparaffinées (voir point 2.2.2) dans des bains de toluène et ensuite réhydratées lors d'une suite de bains d'éthanol de concentration décroissante.

Après déparaffinage, les lames ont été recouvertes d'une solution de blocage (PBS-T-BSA, **Annexe 2**) empêchant l'anticorps de se fixer à des protéines non ciblées, et ce pendant une nuit.

L'anticorps primaire (**Annexe 2**), capable de se lier aux protéines d'intérêt, a ensuite été appliqué sur les lames pendant une durée de 2 heures et un rinçage sous forme de bains de solution tampon (PBS-T, **Annexe 2**) a été effectué. Ensuite, l'anticorps secondaire (**Annexe 2**) couplé à un fluorochrome a été appliqué sur chacune des lames pendant une heure, suivi par un rinçage au PBS-T, ce fluorochrome permet de localiser visuellement les protéines cibles.

Les lames ont ensuite été montées avec une solution de "vectashield" dont le rôle est de conserver les fluorochromes et ont été scellées avec du vernis puis observées au microscope à épifluorescence (Zeiss Axio Scope A1 Microscope, Texas Red).

Les étapes de montage et d'application de l'anticorps secondaire doivent être réalisées dans l'obscurité au vu de la sensibilité des fluorochromes pour la lumière ambiante.

L'ensemble de cette manipulation a été résumé dans la **Fig.2.2**.

### **2.2.3.2 Immunofluorescence en Whole-Mount**

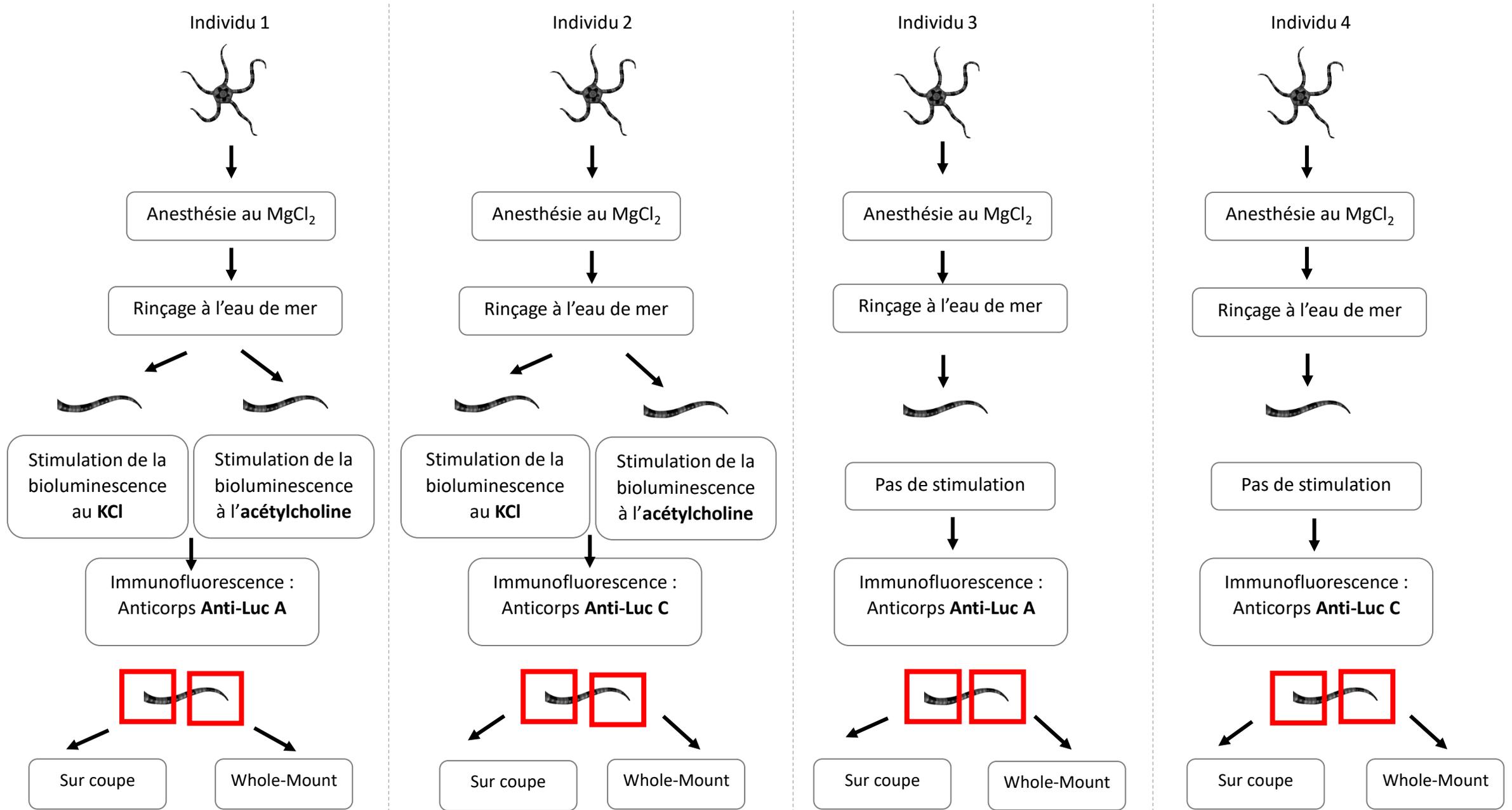
L'immunofluorescence sur l'entièreté du tissu offre une vue d'ensemble et une perspective 3D de l'expression des protéines ciblées. Le processus général de cette technique est similaire à l'immunofluorescence sur coupes, à la différence que chacune des étapes est plus longue, afin de favoriser la pénétration des substances au sein du tissu et les solutions utilisées ont une action plus puissante.

Après fixation et décalcification (**Annexe 2**), les bras d'ophiures entiers ont été réhydratés dans des bains de concentration décroissante en éthanol. Un lavage au PBS a ensuite été effectué, suivi par un blocage d'une durée de 2 heures dans une solution tampon appelée T1 (**Annexe 2**). Les lames ont été recouvertes d'anticorps primaire (**Annexe 2**) pendant une nuit puis rincées dans une solution T2 (**Annexe 2**) avant d'être recouvertes de l'anticorps secondaire (**Annexe 2**) pendant 2 heures à l'obscurité. Pour finir, les lames ont été rincées dans une solution T3 (**Annexe 2**) et montées au vectashield à l'obscurité, puis observées au microscope à épifluorescence (Zeiss Axio Scope A1 Microscope) ainsi qu'au microscope confocal (OLYMPUS IX81 + FV1000). Ce dernier offre la possibilité d'obtenir des photos en série sur toute l'épaisseur de l'échantillon.

### **2.2.3.3 Immunofluorescence après stimulation**

Une partie des expériences d'immunofluorescence ont été menées sur des organismes fixés juste après qu'ils aient émis de la lumière.

Pour ce faire, les ophiures récoltées au mois de mai 2021 à Kristineberg (Lot 3) par les membres de l'équipe de l'UCLouvain ont été maintenues vivantes dans des aquariums alimentés par une source d'eau de mer artificielle dont les conditions physico-chimiques sont modifiées en continu par rapport aux données de salinité et de température effectives dans le fjord de Kristineberg. Quatre individus ont été prélevés et anesthésiés au MgCl<sub>2</sub> 3,5 % (3 min) afin d'éviter l'autotomie. Ceux-ci ont été rincés à l'eau de mer artificielle puis deux bras de chaque individu ont été isolés du disque. Chacun des bras a été placé dans un tube à essai contenant 1 mL d'eau de mer et les tubes ont été positionnés au sein du luminomètre (FB12 tube luminometer (Tirtetek-Berthold, Pforzheim, Germany) calibré avec une source lumineuse 470 nm (Beta light, Saunders Technology, Hayes, UK)) un à un. Les bras ont ensuite été stimulés grâce à l'administration d'1 mL de KCl (200mM) ou d'acétylcholine (1mM) et l'émission de lumière a été mesurée par le luminomètre réglé avec un filtre 1% ayant pour rôle



**Figure 2.3 :** Etapes de stimulation de la bioluminescence sur *A. filiformis*.

d'éviter la saturation du signal. Deux individus ont été stimulés pour l'émission de lumière et les deux autres n'ont pas subi de stimulation.

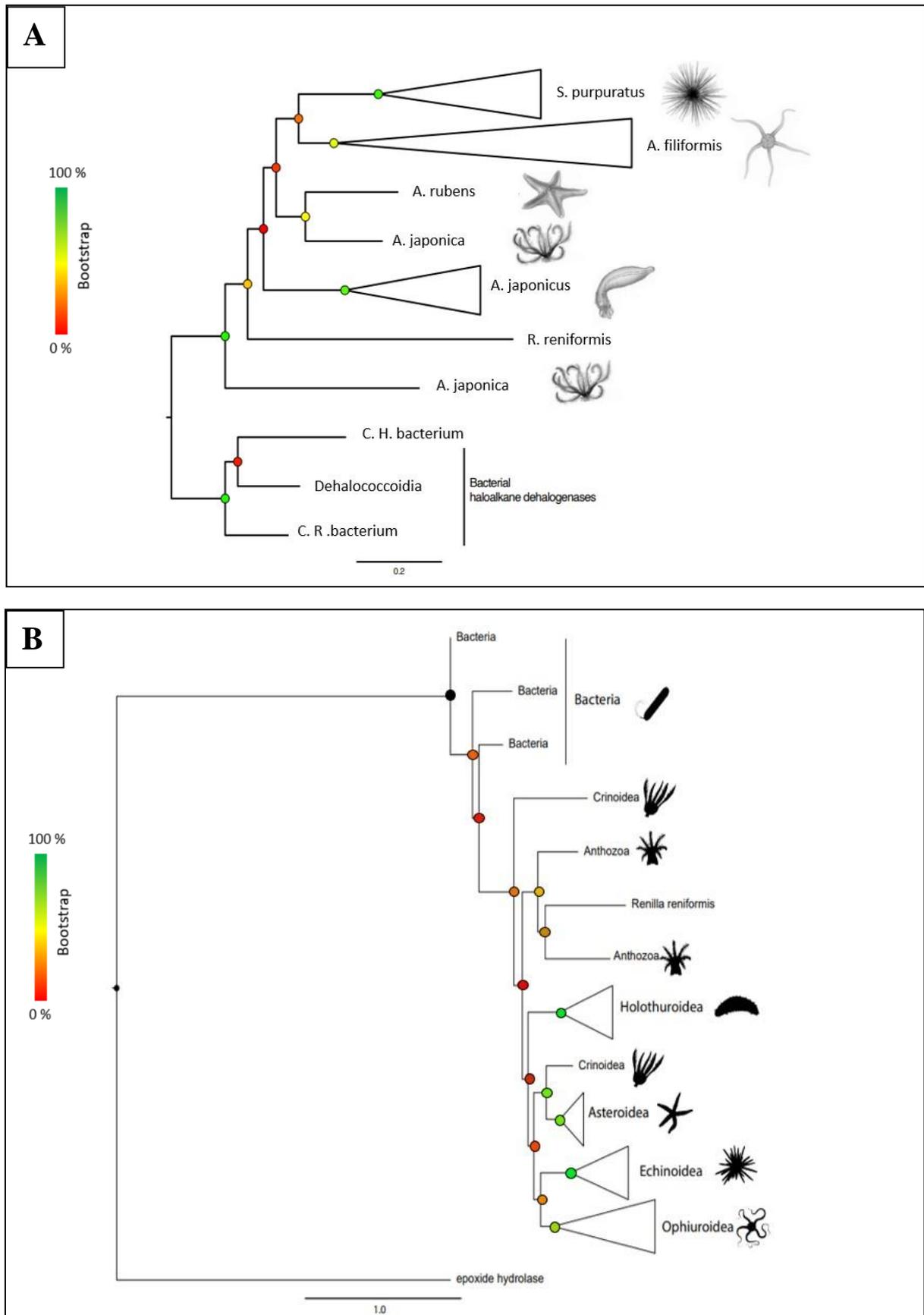
Les bras ont ensuite été fixés au PAF 4% et puis conservés dans l'éthanol 70% à 4°C. Chacun des bras a été divisé en deux et une des parties a été utilisée pour l'immunofluorescence sur coupe quand l'autre a été consacrée à l'immunofluorescence en Whole-Mount. L'anticorps Anti-RLuc A ainsi que l'anticorps Anti-RLuc C ont été utilisés pour mettre en évidence l'enzyme.

L'ensemble de cette manipulation est résumée dans la **Fig.2.3**.

#### **2.2.4 Expression des transcrits au sein des tissus**

Dans la continuité des analyses d'immunohistochimie et d'étude des gènes de luciférase, des analyses complémentaires sur l'expression des différents gènes de luciférase chez *A. filiformis* ont été menées. Les analyses avaient pour but de déterminer si tous les gènes identifiés dans l'analyse BLAST (point 2.1.2.1) étaient exprimés et d'examiner leur niveau d'expression. Les expériences ont été menées selon le protocole de Lengerer *et al.*, 2018 et Lengerer *et al.*, 2019.

La première étape pour obtenir ces informations était d'extraire l'ARNm des tissus. Cela a été réalisé grâce au kit « ThermoFisher : TRIzol™ Reagent ». Les étapes de l'extraction sont la lyse des tissus, la séparation des pièces calcifiées et la séparation des acides nucléiques et des protéines. La deuxième étape consiste à synthétiser de l'ADN complémentaire qui pourra ensuite être amplifié. La technique adoptée est une RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain reaction) utilisant l'enzyme transcriptase inverse capable de synthétiser de l'ADN complémentaire à partir d'ARN. La synthèse d'ADNc a été réalisée à partir d'un kit « Reverse transcription » de Roche. La troisième étape est l'amplification d'ADNc : l'ADNc obtenu a été amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction) suivant le kit de Biolabs « PCR Using Q5 High-Fidelity DNA Polymerase ». L'ADNc a été mis en contact avec l'enzyme polymérase (Q5) et les amorces spécifiques (**Annexe 3A**) puis mis à incuber dans un thermocycleur (Bio-Rad icycler) suivant 3 étapes (**Annexe 3B**). Une fois le matériel génétique amplifié, le poids moléculaire des acides nucléiques a été vérifié grâce à un gel d'électrophorèse (kit « GelRed® Nucleic Acid Gel Stain » de Biotium).



**Figure 3.1 :** Constructions phylogénétiques regroupant les séquences protéiques homologues de RLuc/HD de bactéries, de cnidaires et d'échinodermes. (A) Enracinement par les séquences bactériennes HD. (B) Enracinement par une séquence homologue non RLuc/HD (époxyde-hydrolase). \*Légende : le code couleur indique les valeurs de bootstrap. Numéro d'accèsion des séquences : voir Annexe 1\*

# 3 RÉSULTATS

---

## 3.1 Evolution des protéines homologues RLuc/HD

### 3.1.1 Distribution des protéines homologues RLuc/HD dans l'arbre du vivant

Depuis la découverte et la caractérisation de la luciférase de *Renilla*, la littérature suggère qu'un transfert horizontal de gène bactérien est à l'origine de la présence du gène chez le cnidaire modèle. Les études récentes laissant entrevoir la présence de séquences homologues chez différents autres taxa (echinodermes, urochordés,...) et en particulier chez l'échinoderme lumineux *A. filiformis*, la question de l'origine (ou des origines) du/des gène(s) chez les métazoaires reste non-résolue et énigmatique.

Afin de rendre compte de la distribution de ce gène dans l'arbre de la vie, une recherche de séquences homologues (c.à.d., homologues proches) a été réalisée sur l'ensemble du vivant. Les résultats montrent la présence de séquences homologues à RLuc dans 6 embranchements métazoaires différents, à savoir Annelida, Chordata, Cnidaria, Echinodermata, Hemichordata et Placozoa. Parmi les autres embranchements eucaryotes, aucun n'a présenté de séquences homologues à RLuc et chez les bactéries, au moins 7 embranchements sont concernés (**Annexe 1**). Chez les cnidaires, seule la classe des anthozoaires possède des séquences homologues et chez les échinodermes, toutes les classes présentent des séquences homologues. Cette liste (**Annexe 1**) est constituée de séquences annotées automatiquement comme des luciférases et d'autres comme des haloalkane déhalogénases. Cependant, pour la majorité de ces gènes/protéines, la fonction/activité biologique n'a pas été confirmée.

On peut également trouver plusieurs séquences homologues chez une même espèce, et on observe que le nombre de séquences est variable suivant l'espèce étudiée. Chez les urochordés, hémichordés, cnidaires, céphalochordés et chez les bactéries, on trouve entre 1 et 3 gènes alors que chez les échinodermes, le nombre de gènes varie entre 1 et 10, les génomes d'oursin et d'*A. filiformis* possédant respectivement 7 et 10 gènes homologues RLuc/HD. Le nombre de gènes peut indiquer la présence de duplications de gènes.

### 3.1.2 Reconstructions phylogénétiques basées sur les séquences homologues

L'arbre phylogénétique généré (**Fig.3.1A**) contient les séquences homologues RLuc/HD obtenues par recherche BLAST chez les échinodermes (modèles de notre étude), les

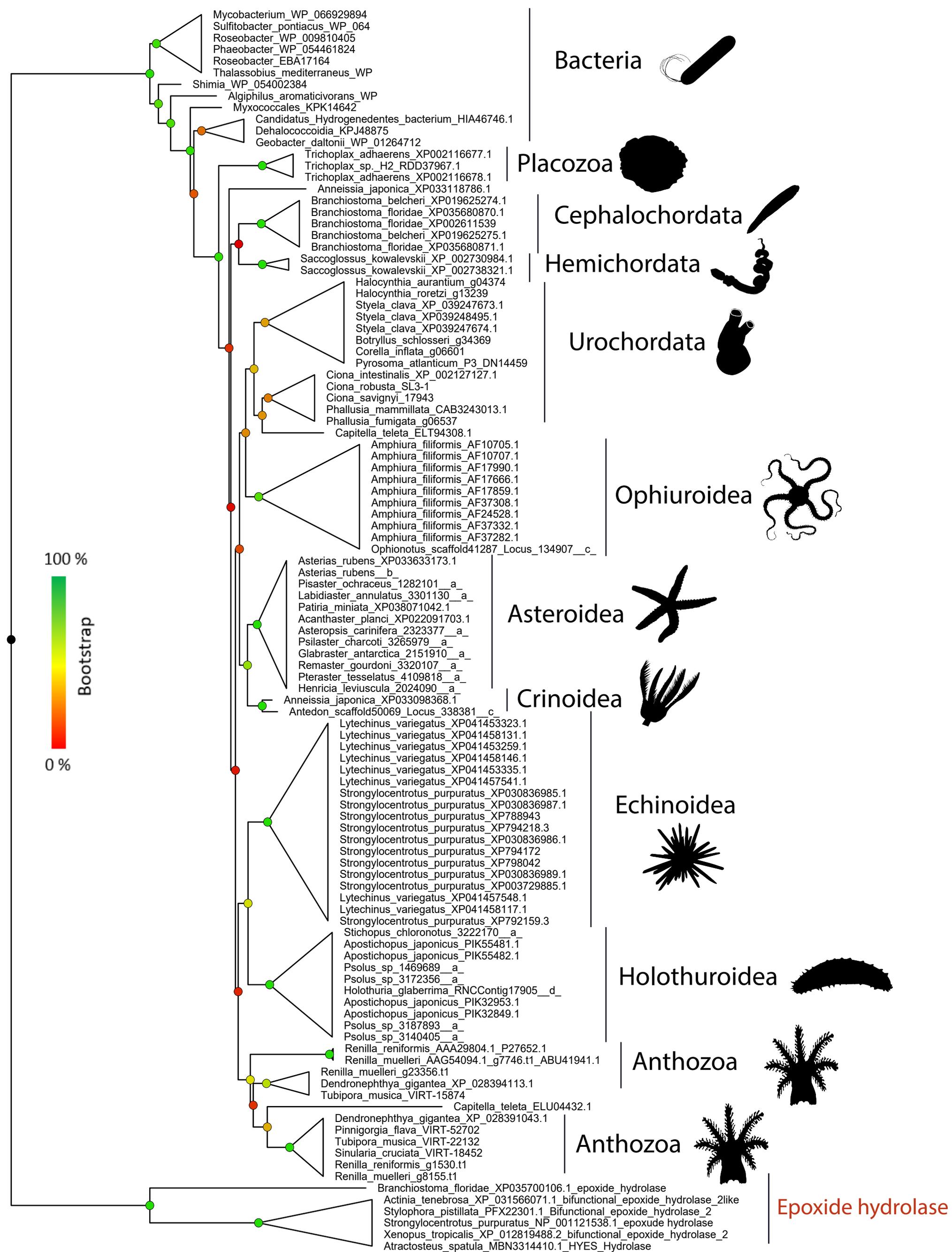


Figure 3.2 : Arbre phylogénétique regroupant les séquences protéiques homologues de RLuc/HD de bactéries, de cnidaires et d'échinodermes, enraciné avec des séquences d'époxide-hydrolase. \*Légende : le code couleur indique les valeurs de bootstrap.\*

bactéries et *Renilla reniformis*. Sur base de la littérature, l'enracinement de l'arbre s'est fait avec le groupe des bactéries (Delroisse *et al.*, 2017a).

Au cours de ce travail, une seconde construction phylogénétique (**Fig.3.1.B**) s'est voulue plus large et a englobé l'ensemble des séquences homologues RLuc/HD chez les cnidaires. De plus, l'utilisation des séquences de HD bactériennes comme outgroup, bien que classiquement utilisée dans la littérature, est problématique si on souhaite retracer l'évolution de ces gènes/protéines (en particulier pour vérifier l'hypothèse de l'origine bactérienne des RLuc/HD). Les séquences de HD bactériennes ont donc été intégrées à notre "ingroup" et une séquence d'époxide hydrolase de *Branchiostoma floridae*, étant la séquence de protéine homologue la plus proche et non identifiée comme RLuc/HD, a remplacé les bactéries pour l'enracinement de l'arbre.

Enfin, une analyse finale (**Fig.3.2**) a été réalisée afin d'englober l'ensemble des séquences homologues RLuc/HD retrouvées par recherche BLAST (**Annexe 1**) dans les bases de données et auprès de collaborateurs (e.g., Tessler *et al.*, 2020). Cet échantillonnage élargi permet de représenter au mieux la diversité de ces gènes et de limiter les biais d'analyses liés à un échantillonnage restreint (Heath *et al.* 2008).

L'analyse montre que pour chacun des arbres fournis (**Fig.3.1; Fig.3.2**), les séquences de la classe des ophiures forment un groupe monophylétique. Il en est de même pour les autres classes, mis à part pour celle des crinoïdes chez les échinodermes. De plus, l'embranchement des cnidaires est monophylétique et celui des échinodermes est paraphylétique. Pour les arbres A et B (**Fig.3.1**) cependant, si on ne tient pas compte de la séquence de crinoïde, l'embranchement devient monophylétique. Notons que cette séquence de crinoïde a été retirée de l'analyse dans l'arbre final (**Fig.3.2**) à cause de la petite taille de la séquence.

Dans les trois arbres, le clade des métazoaires est également monophylétique. Cependant, certains clades ne respectent pas la phylogénie actuelle de référence. C'est le cas notamment pour les arbres A et B (**Fig.3.1**), où les ophiures sont dans les deux cas groupées avec les oursins. Concernant l'arbre final (**Fig.3.2**), la phylogénie des échinodermes est à nouveau altérée. La classe des crinoïdes n'est pas positionnée à la base de l'embranchement mais au sein des astérozoaires. De plus, les urochordés et les cnidaires sont intégrés dans l'embranchement des échinodermes, les urochordés forment un groupe monophylétique avec les ophiuroïdés et les cnidaires en forment également un avec les échinozoaires. On remarque



**Figure 3.3** : Structure des gènes homologues Rluc/HD. \*Légende : Chaque ligne représente un contig. Les flèches représentent le gène et le sens du gène. Chaque barre verte représente un exon.\*

également que le groupe des cnidaires est distant de celui des placozoaires, groupe duquel il est le plus proche phylogénétiquement.

Cependant, tant pour les arbres A et B (**Fig.3.1**) que pour l'arbre final (**Fig.3.2**), les groupements inattendus cités ci-dessus sont soutenus par des valeurs de bootstrap relativement faibles, ce qui signifie que cette topologie n'a pas été retrouvée pour chaque essai (500 et 1000 ici) de construction de l'arbre. On observe, à l'inverse, des valeurs de bootstrap élevées au sein de chacune des classes.

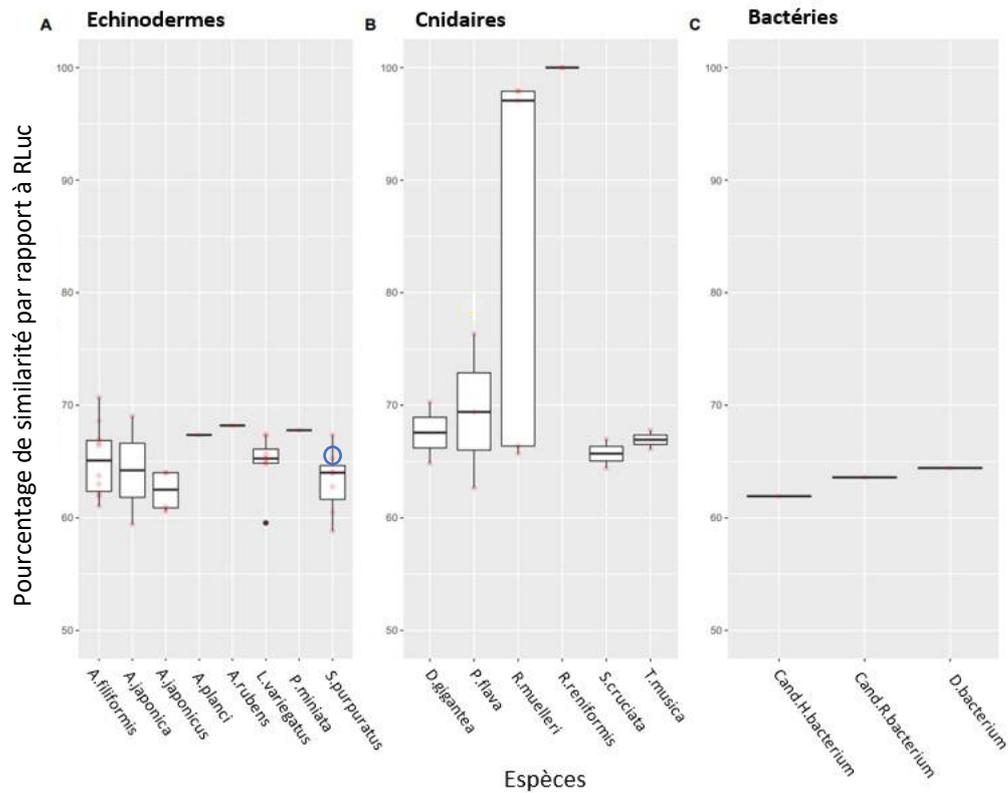
Les séquences de *Capitella teleta* sont représentées par de longues branches, ce qui désigne un taux de substitution par site plus élevé, en d'autres mots un taux d'évolution plus rapide, et cela peut avoir un impact sur la représentation phylogénétique globale (Bergsten, 2005). Un second arbre (données non présentées) a été réalisé en excluant ces séquences et n'a pas montré de différence de topologie.

### **3.1.3 Etude de la structure des gènes homologues de RLuc/HD**

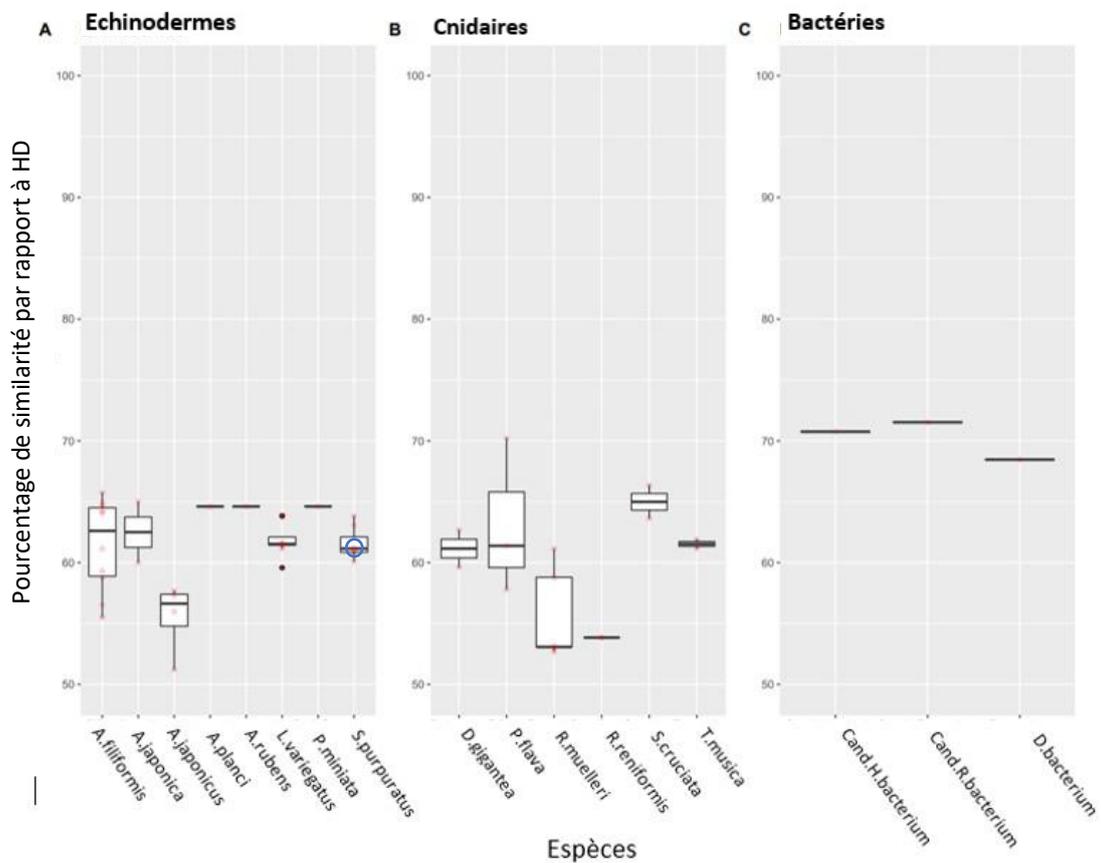
L'analyse de la structure des gènes a permis de mettre en évidence la taille des gènes, leur sens et leur position sur le chromosome ou le contig, ainsi que leur structure intronique. L'étude de la structure des gènes a été réalisée chez les échinodermes, les cnidaires, les urochordés, les céphalochordés, les hémichordés et les bactéries (**Fig.3.3**) et un détail pour l'espèce *A. filiformis* est disponible en **Figure 3.4** (voir **Annexe 4**).

La taille des gènes s'avère être fortement variable. De manière globale, on observe une divergence de taille importante dans l'embranchement des échinodermes alors qu'au sein de chacun des autres groupes, les tailles de gènes sont similaires. Celle-ci est directement dépendante de la présence ou l'absence d'introns. On remarque effectivement que les espèces possédant des introns dans les gènes ont des gènes de plus grande taille. Notons cependant que les différences de taille des gènes pourraient être dues à un biais de prédiction des introns.

On s'intéresse également à la présence ou l'absence d'introns car les hypothèses évolutives suggèrent un transfert horizontal de gènes bactériens vers les métazoaires. Ainsi, étant donné que les génomes bactériens ne possèdent pas d'introns, la trace de gènes dépourvus d'intron chez les métazoaires peut indiquer un transfert horizontal. Concernant ceci, on remarque que chez les échinodermes, seuls les Echinozoa (oursins et holothuries) présentent des introns et chez les cnidaires, seul l'anthozoaire *Dendronephthya gigantea* possède un intron. On trouve également des introns chez les céphalochordés et chez les urochordés. Le nombre d'intron par gène se situe entre 1 et 4. On retrouve un intron par gène chez le concombre de



**Figure 3.5 :** Pourcentage de similarité par rapport à RLuc de protéines RLuc-homologues de cnidaires, d'échinodermes et de bactéries. \*Légende : chaque point rouge représente une protéine.\*



**Figure 3.6 :** Pourcentage de similarité par rapport à HD de protéines RLuc-homologues de cnidaires, d'échinodermes et de bactéries. \*Légende : chaque point rouge représente une protéine.\*

mer (*A. japonicus*), 2 chez les oursins (*S. purpuratus* et *L. variegatus*), 3 chez les céphalochordés et 4 chez les urochordés. Les espèces lumineuses, ici *A. filiformis*, *R. reniformis* et *R. muelleri*, possèdent des gènes dépourvus d'introns.

On observe également que le sens des gènes varie, tant entre les espèces qu'au sein d'une même espèce.

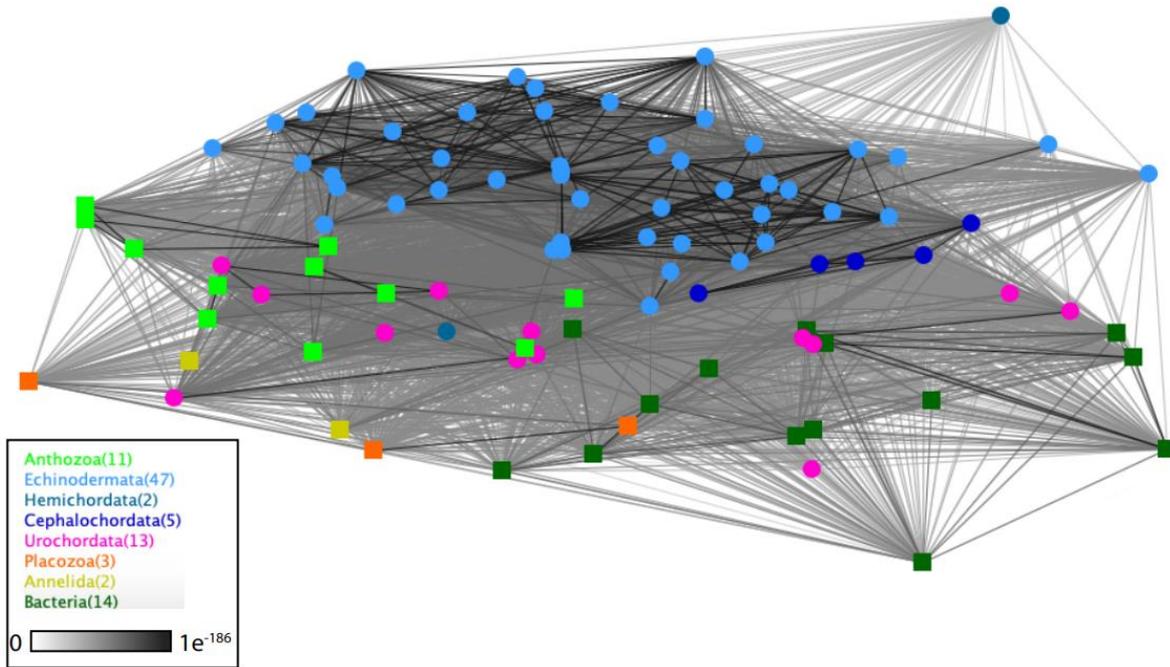
### **3.1.4 Similarité par rapport à RLuc et HD**

Dans le cadre de l'hypothèse de la cooptation de gènes, nous nous intéressons à une potentielle co-occurrence des fonctions luciférase et haloalkane déhalogénase chez une même espèce. Précisément, cette recherche s'applique aux espèces lumineuses, c'est-à-dire *A. filiformis*, *R. reniformis* et *R. muelleri*, et en particulier à *A. filiformis* puisqu'on trouve 10 gènes homologues de RLuc/HD chez cette espèce. Cependant, à titre de comparaison, l'ensemble des séquences homologues RLuc/HD des cnidaires, des échinodermes et des bactéries a été intégrée à la recherche. Une analyse de similarité entre les séquences d'intérêt et les séquences de référence RLuc et HD - dont la fonction a été démontrée biochimiquement (RLuc (AAA29804, fonction luciférase), HD (2qvb.1, fonction déhalogénase)) - a alors été effectuée (**Fig.3.5**, **Fig.3.6**).

Le graphique de la similarité par rapport à RLuc (**Fig.3.5**) informe sur l'étendue de la similarité des gènes au sein de chaque espèce, ce qui représente la variabilité intragroupe des gènes. On observe que chez *A. filiformis*, *A. japonicus*, *P. flava* et chez *R. muelleri*, l'étendue des "boîtes à moustaches" est importante. Mais, mis à part dans le cas de *R. muelleri*, celle-ci n'est pas suffisante pour distinguer des "clusters de gènes", c'est-à-dire des gènes regroupés ensemble sur base de leur similarité par rapport à RLuc, au sein d'une même espèce. L'aspect très étendu de la "boîte à moustaches" chez *R. muelleri* et la similarité élevée de 2 des 3 séquences avec RLuc atteste d'une sélection forte pour ces deux séquences.

De manière globale, la similarité par rapport à RLuc (**Fig.3.5**) se situe entre 60 et 70% pour les séquences d'échinodermes, entre 60 et 100% pour les cnidaires et entre 60 et 65% pour les bactéries. Celle-ci s'avère être élevée dans tous les cas, mais seules les séquences de *R. reniformis* et deux des séquences de *R. muelleri* sont similaires à plus de 95% à RLuc et peuvent prétendre exercer la même fonction.

Concernant la similarité par rapport à HD (**Fig.3.6**), les embranchements échinodermes et cnidaires présentent une similarité allant de 50 à 70%. Chez les cnidaires, on observe que les



**Figure 3.7 :** Analyse en clustering représentant la similarité entre les séquences homologues de RLuc/HD chez les métazoaires et les bactéries. \*Légende :L'intensité des liaisons représente la similarité. Chaque couleur représente un embranchement.\*

**Tableau 3.1 :** Résultats de la création de modèles 3D à partir de séquences protéiques de luciférase chez *Amphiura filiformis*, *Renilla reniformis*, *Pyrosoma atlanticum* et *Strongylocentrotus purpuratus*. \*Légende : QMEAN : indice de qualité du modèle basé sur la comparaison de la séquence protéique avec un structure cristallographique préexistante dans le système.\*

Séquence	Indice de qualité du modèle (QMEAN)			Liaison au ligand Coelenté-ramide	Conservation de la pentade catalytique					
	RLuc	HD	AncHLD-RLuc		Asp (D)	His (H)	Glu (E)	Trp (W)	Asn (N)	Ala (A)
RLuc	0.91	0.80	Non applicable	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
PyroLuc	0.74	0.77	0.82	✗	✓	✓	✓	✓	✓	Pro
SpurHD	0.75	0.72	0.74	✗	✓	✓	✓	✓	✓	Pro
AF10707.1	0.78	0.76	0.80	✗	✓	✓	✓	✓	Asp	Pro
AF37282.1	0.80	0.76	0.86	✗	✓	✓	✓	✓	✓	Pro
AF37308.1	0.79	0.79	0.87	✗	✓	✓	✓	✓	✓	Pro
AF37332.1	0.80	0.78	0.87	✗	✓	✓	✓	✓	✓	Pro
AF17859.1	0.76	0.75	0.81	✗	Glu	Asn	✓	✓	✓	Pro

séquences fortement similaires à RLuc (séquences de *Renilla*) sont les moins similaires à HD. En ce qui concerne les bactéries, la similarité de séquences se situe aux alentours de 70%.

Notons que chez *S. purpuratus*, la séquence XP\_030836986.1 (entourée en bleu sur le graphique), a été étudiée fonctionnellement et est connue pour sa fonction haloalkane déhalogénase. Malgré cela, la similarité partagée avec la HD de référence ne dépasse pas les 65%.

Premièrement, ces deux graphiques montrent que les séquences annotées comme luciférase ou HD dans les bases de données (annotation luciférase pour toutes les séquences cnidaires et échinodermes et annotation HD pour les séquences bactériennes) ne présentent pas forcément une similarité élevée avec les protéines de référence, respectivement RLuc et HD. Deuxièmement, même dans le cas où la fonction de la protéine a été prouvée (*S. purpuratus* : XP\_030836986.1), on ne trouve pas forcément une similarité très élevée avec la séquence de référence (HD ici). En résumé, dans le cas de RLuc/HD, la similarité n'est pas indicatrice de la fonction de la protéine.

### **3.1.5 Analyse par “clustering”**

Les analyses de similarité montrent que faire la distinction entre les enzymes luciférase et haloalkane déhalogénase n'est pas aisé. Une analyse par “clustering” a été réalisée afin de mieux comprendre la diversité des séquences homologues RLuc/HD. Dans cette analyse, il s'agit de comprendre à quel point les séquences sont similaires entre elles (2 à 2) et si des séquences assignées à la même fonction se retrouvent plutôt groupées ou éloignées.

D'après cette analyse (**Fig.3.7**), on constate que les séquences d'échinodermes sont regroupées dans un cluster distinct, c'est le cas également pour les céphalochordés. En revanche, les séquences bactériennes sont relativement éloignées entre elles et présentent des valeurs de similarité (intensité de la liaison) plutôt faibles. Un schéma analogue est observé chez les autres groupes, à savoir les anthozoaires, les urochordés, les placozoaires et les annélides. Les deux séquences des hémichordés sont particulièrement distantes. De manière globale, on n'observe pas de regroupement de séquences selon la fonction (suivant les annotations voir **Annexe 1**), c'est-à-dire que les séquences luciférase et haloalkane déhalogénase ne semblent pas particulièrement séparées.

### **3.1.6 Site actif et structure 3D des protéines**

Les analyses précédentes mettent en évidence la difficulté à distinguer une enzyme luciférase d'une enzyme haloalkane déhalogénase. A ce sujet, la fonction d'une protéine réside

```

...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...|
5      15      25      35      45      55      65      75      85      95
Rluc(AAA29804.1) MT-----SKVY DPEQRKR---MIT GPQMMARCKQ MNVLDSFINY YDSE---KHA ENAVIFLHFN
PyroLuc(P3_DN14459) KACVCICYFN FSNMMLISLV SK-----SS GLLRNLKSCY QPKMFSQLAR -----KQ IDVIDGKISY ZDSE---QNC QNMIFLHFN
SpurHLD(XP_030836986.1) MAF-----R SIGSRQLQTHL GH-----KHIAV VHLVA-----RVVSRFQ STIP---LVT ADEWMGKCKK VDVLGSKMSY YDSDPQRNSG KRTAVFLHFN
Rluc8(2psj.1.A) -----SKVY DPEQRKR---MIT GPQMMARCKQ MNVLDSFINY YDSE---KHA ENAVIFLHFN
HLD(2o2i.1.A) -----F GVEPYGQPKY LEIAGKRMAY ID----EGK GDAVIFQHFN
AncHLD-RLuc(6g75.1.A) -----AT GDEWMAKCKQ VDVLDSMSY YSDP--GKH KNTVIFLHFN
AfiLuc(AF37308.1) -----MFPTTAR ALASYSPSQA AEEWMAKCKRQ IKVLDAEMSY YDSDPE-EKQ SRVAVFLHFN
AfiLuc(AF37332.1) MAS-----S DALNRLQVVA KHFEVPTFR SVVNHVLSV PTGVHPTSTS AGIT---SKS ATEWMAKCKR INILDCMSY YSDPA-GKS KNAVIFLHFN
AfiLuc(AF37282.1) MDA-----H KAQGRQLNLS RQIRPKPITS SVIVT-----PCGSETNSSD PRTLFPVSKS GTEWMAKCKRQ IMVLDCMSY YSDPA-GKS KNAVIFLHFN
AfiLuc(AF10707.1) MK-----LF SILRTPNKTT TENLRQKMD SAFT---TKT AADMWMAKCKR VKVLDSMSY YSDPE-QKH SHAVVFLHFN
AfiLuc(AF17859.1) -----MAQTCGY GAAPYQPSV ADGWFKNSHR CRVLDEVFSY FDTDPCNRKK LPVVIFLHFN

...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...|
105     115     125     135     145     155     165     175     185     195
Rluc(AAA29804.1) A S S Y L W R H V V P H I E P V A R C I I P D L I G M G K S G K S G N G S -- -Y R L L D H Y K Y L T A W F E L L N - - - - - L P K K I I F V G D N A C L A F H Y S Y E H Q D K I K A I V H A
PyroLuc(P3_DN14459) P T S S L L W R N I L P H L C D D F H C L A P D L I G M G K S S K L K N S L - - -Y T F D D H Y K Y I C E W I D K L D - - - - - L Q E K V I L V C D N K S A L A F H M A N L N Q E R V Q A L V H M
SpurHLD(XP_030836986.1) P T S S Y L W R N V I P Q V E P I A R C L A P D L I G M G R S D K L A S R S - - -Y R F L D H Y R Y L S A W F D A L K - - - - - L P E K I T V V C D N K T A L G L H M C N E H R D R L E A I V H M
Rluc8(2psj.1.A) A S S Y L W R H V V P H I E P V A R C I I P D L I G M G K S G K S G N G S - - -Y R L L D H Y K Y L T A W F E L L N - - - - - L P K K I I F V G D N A A L A F H Y A Y E H Q D R I K A I V H M
HLD(2o2i.1.A) P T S S Y L W R N I M P H L E G L G R L V A C D L I G M G A S D K L S P S G P D R Y S Y G E Q R D F L F A L W D A L D - - - - - L G D H V V L V L D N K S A L G F D M A N Q H R D R V Q G I A F M
AncHLD-RLuc(6g75.1.A) P T S S Y L W R N V I P H V E P L A R C L A P D L I G M G K S G K L P N H S - - -Y R F V D H Y R Y L S A W F D S V N - - - - - L P E K V T I V C D N K S G L G F H M C H M R D R V G I V H M
AfiLuc(AF37308.1) P T S S F L W R N V I P H V E P V A R C L A P D L I G Q G R S S K R A N H S - - -Y R F E D H Y R Y L S E W F D S V Q - - - - - L P N K V N I V I D N K S A L G F H M S R M H P D R I D S I T H M
AfiLuc(AF37332.1) P T S S F L W R N I I P H V E P V A R C L A P D L I G Q G R S S K R V N H S - - -Y R F V D H Y R Y L S E W F D S V N - - - - - L P E K V T F V I D N K S G L G F H M C H M H P D R V A A I T H M
AfiLuc(AF37282.1) P T S S F L W R N I I P H I E P V A R C L A P D L I G Q G R S S K R A N H S - - -Y R F V D H Y R Y L S E W F D S V N - - - - - L P E K V T L V I D N K S A L G F H M C H M H P N R V A S I V H M
AfiLuc(AF10707.1) P T S S F L W R N V I P H V A P V A R C L A P D L I G M G R S S K R A N H S - - -Y R A E D H Y R Y L S E W F D S V K - - - - - L P A K V N L V I D N K S I L G F H M G H M H N D R V S I T Y M
AfiLuc(AF17859.1) P T S S I L W R K V I P H I E S E A R C L A P D L I G M G R S S K R E N H Q - - -Y R F E D H Y K Y L E A W I E G M Q S T N N I N K V P K K I S F V G E K A A L A F H M S K M H P D R V T S I T H M

...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...|
205     215     225     235     245     255     265     275     285     295
Rluc(AAA29804.1) E I V V D V I E - S W D E W P D - I E E D I - A L I K S E E G E K M V L E N N F F V E T M L P S K I M R K L E P E E F A A Y L E P F K E K G E V R R P T L S W P R E I P L V K G G K P D V V Q I V R N Y
PyroLuc(P3_DN14459) E I L P C P M T - - W D D F P A - A G R K I F Q L M R S S A G E E L I L K N Y F V T K I L P S S V M R T L H E E E M S A Y V E P F V H E - D D R M P T L T W P R E I P I L P E G P E N V V S Y A R S Y
SpurHLD(XP_030836986.1) E I V Y Q P M T - - W D I F P D - S M R D I F L A L R S S A G E E M I L K N N M F I E T I L P L A I K R K L R Q E E M D A Y R E P F K N P G E D R R P L L T F P R Q I P Q I G E G P E E T V A I V T A Y
Rluc8(2psj.1.A) E I V V D V I E - S - - E W P D - I E E D I - A L I K S E E G E K M V L E N N F F V E T V L P S K I M R K L E P E E F A A Y L E P F K E K G E V R R P T L S W P P D V V Q I V R N Y
HLD(2o2i.1.A) E I I V T P M T - - W A D W P P - A V R G V F Q G F R S P Q G E P M A L E H N I F V E R V L P G A I L R Q L S D E E M N H Y R R P F V N G G E D R R P T L S W P R N L P I D G E - P A E V V A L V N E Y
AncHLD-RLuc(6g75.1.A) E I V V S P L K - G W E S F P E - T A R D I F Q A L R S E A G E E M V L K K N F F I E R L L P S S I M R K L S E E E M A Y R E P F V E P G E S R R P T L T W P R E I P I G D G P E D V I E I V K S Y
AfiLuc(AF37308.1) E I V V R S V P - G W A F P D - V A K G V F Q A L R S E A G E E M V L K K N F F V E R L L P G A I L R E L S E D E M N A Y R E P F A K P G E D R R P T L T W P R E I P V E G D G P D D V I K I A N D Y
AfiLuc(AF37332.1) E I V V G S M Q A G W E V F P E - H G R K D F Q A L R T E A G E Q M V L K N N F F V E K Y L P A T I L R N L S E D E M N A Y R E P F A N P G E D R R P T L T W P R E I P V E G D G P E D V I N I A N D Y
AfiLuc(AF37282.1) E I L V R A F P - G W P G F P T L R A T D V F Q N L R S E A G D D L V L G N F F V E S I L P L A I M R D L T E D E M N A Y R Q P F V N P G E D R R P T L T W P R E V P I E G D G P E D V I K I A H D Y
AfiLuc(AF10707.1) E I L L R P W - M D D T I P E - E V R N L T V A L R S E A G D E M V L K N N Y M I E K F I P G L V M R K L S E D E M N A Y R E P V N P G E D R R P T L T F T R E I P I E G D G P E Y V M K I A N D Y
AfiLuc(AF17859.1) E I L C F V W P - S W K Y Y T H - D V Q V G L R A I R S E T G E A L V L S N N Y F I D R V L P G A I I N K L S D D E Y N A Y R E P F I N P G E D R R P C L T W A R E I P I R G E G P A D V E K I V D D F

...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...
305     315     325     335     345     355     365
Rluc(AAA29804.1) N A Y L R A S D D L P K M F I E S D P G - F F S N A I V E G A K K F P N T E F V K V K G H L F S Q E D A P D E M G K Y I K S F V E R V L K N E Q - -
PyroLuc(P3_DN14459) Y N Y L S N S P L L P K L Y I N A V P G - F F S P W I V E K T K T W P N H K Q V N V K G H L F L Q E D S A A D I V H E I K Q F L N Q S I L F K S S L
SpurHLD(XP_030836986.1) H A W I K G T E D L P K F R I L P T P G - I F S E W N T G I T K D W P N H K V V Q V E G S H F F Q E D S P I Q T G D Y I K E F L S S I F K - - -
Rluc8(2psj.1.A) N A Y L R A S D D L P K L F I N A D P G - F F S N A I V E G A K K F P N T E F V K V K G H L F L Q E D A P D E M G K Y I K S F V E R V L K N E - - -
HLD(2o2i.1.A) R S M L E E T - D M P K L F I N A E P G A I I T G R I R D Y V R S W P N Q T E I T V P G H F V Q E D S P E I G A A I A Q F V R R L R S - - - -
AncHLD-RLuc(6g75.1.A) N K N L S T S K D I P K L F I N A D P G - F F S N A I K V K T K N W P N Q K T V T V K G H L F L Q E D S P E I G E A T A D F L N E L T K - - - -
AfiLuc(AF37308.1) F H Y F L E A K H I P K L Y I D G D P G - F F S P S L R K I M D I W P N Q Q V V R V K G H L F L Q E D S P K E I G E A V R D F L T N T V Y K - - - -
AfiLuc(AF37332.1) F E M F C G T N D I P K L F I D G E P G - Y F S P L I R R V M E F W P N Q E T V R V K G H L F L Q E D S P K E I G D A I R A F L K K V L N - - - -
AfiLuc(AF37282.1) F K W L C E S K D I P K L Y I D G E P G - F F S E N L R L K H W I P N Q K T V Q V K G H L F L Q E D S P D E I G R E T K D F L I K N V Y I N - - - -
AfiLuc(AF10707.1) F D Y F R E A K H I P K L C I T G D P G - C I A - - - I L K F I D M W P N Q Q V K S V K G H L F L Q E D S P K E I G E A V K E F L T N T V - - - -
AfiLuc(AF17859.1) Y K Y F C A K A T N I P K L Y I E A S E G - I V G E G G K I M G K W P N Q Q N K T L K G N V M L D S P T E C G E A I R D F L K Y S V F N K - - -

```

**Figure 3.8**: Alignement de séquences protéiques comprenant les séquences des modèles 3D de référence (Rluc8,HLD,Anc-Rluc-HLD) ainsi que les séquences de luciférase de *Amphiura filiformis* (AfiLuc), de *Renilla reniformis* (Rluc),de *Pyrosoma atlanticum*(PyroLuc) et la séquence HD de *Strongylocentrotus purpuratus* (SpurHLD).

également dans sa structure 3D et dans la composition de son site actif. En l'occurrence, le site actif de la luciférase et de la déshalogénase ont été décrits comme étant identiques mais la différence pourrait demeurer au niveau d'un acide aminé voisin de Asn. À cet égard, un alignement rassemblant les séquences protéiques d'*A. filiformis* et des séquences de protéines testées fonctionnellement a pour but d'évaluer si les séquences d'*A. filiformis* sont fonctionnelles et si c'est le cas, quelle fonction est exercée par chaque protéine.

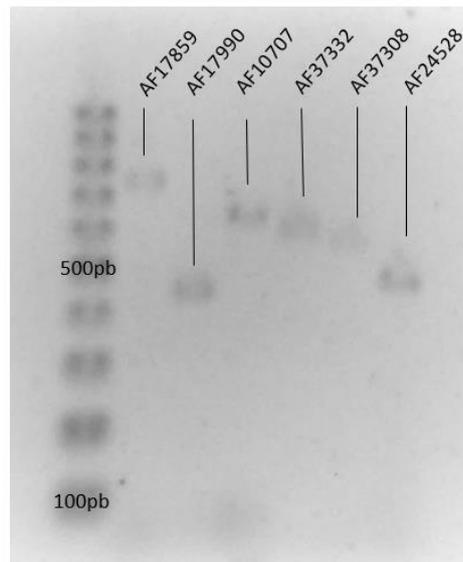
L'alignement de séquences (**Fig.3.8**) et le tableau ci-joint (**Tableau 3.1**) montrent que 3 des 5 séquences d'*A. filiformis* (AF37282.1, AF37308.1, AF37332.1) présentent l'ensemble de la pentade catalytique constituant le site actif. De plus, on observe que l'acide aminé en position voisine de Asn du site actif est une Proline (Pro) pour toutes les séquences d'*A. filiformis*. En comparaison, une Alanine (Ala) est présente chez RLuc et une Proline (Pro) occupe cette place chez PyroLuc. Chez l'oursin *S. purpuratus*, la séquence déshalogénase (XP\_030836986.1) appelée ici SpurHD présente elle aussi un voisin proline (Pro) à Asn.

Afin d'obtenir une idée plus précise de la fonction des séquences d'*A. filiformis*, des modèles 3D des protéines d'*A. filiformis* ont été générés sur base de structures cristallographiques de RLuc et de HD, et une valeur de QMEAN (qualité du modèle) est disponible dans le **Tableau 3.1**. De plus, le modèle fourni pouvait ou non se lier à un ligand, ici la coelenteramide, selon la conformation produite.

En moyenne, les données indiquent une compatibilité similaire des séquences d'*A. filiformis* avec les modèles de RLuc et de HD. De plus, les 5 séquences affichent à peu près les mêmes valeurs d'indice de qualité. La valeur de QMEAN la plus haute est systématiquement trouvée pour l'ancêtre commun RLuc/HD. Une analyse de QMEAN en trois dimensions a révélé que les sites actifs se situent dans une zone où la valeur de QMEAN est élevée (données non présentées). Notons qu'aucune des structures 3D n'a permis une liaison avec le ligand, mis à part la protéine RLuc.

### **3.1.7 Etude du niveau d'expression des gènes de luciférase chez *A. filiformis***

En continuité avec les analyses sur les gènes d'*A. filiformis*, l'étude s'est intéressée à l'expression des gènes homologues RLuc/HD au sein des tissus de l'animal. Ainsi, une extraction d'ARN à partir d'un bras d'ophiure puis une amplification d'ADN a permis d'évaluer le niveau d'expression des différents gènes.



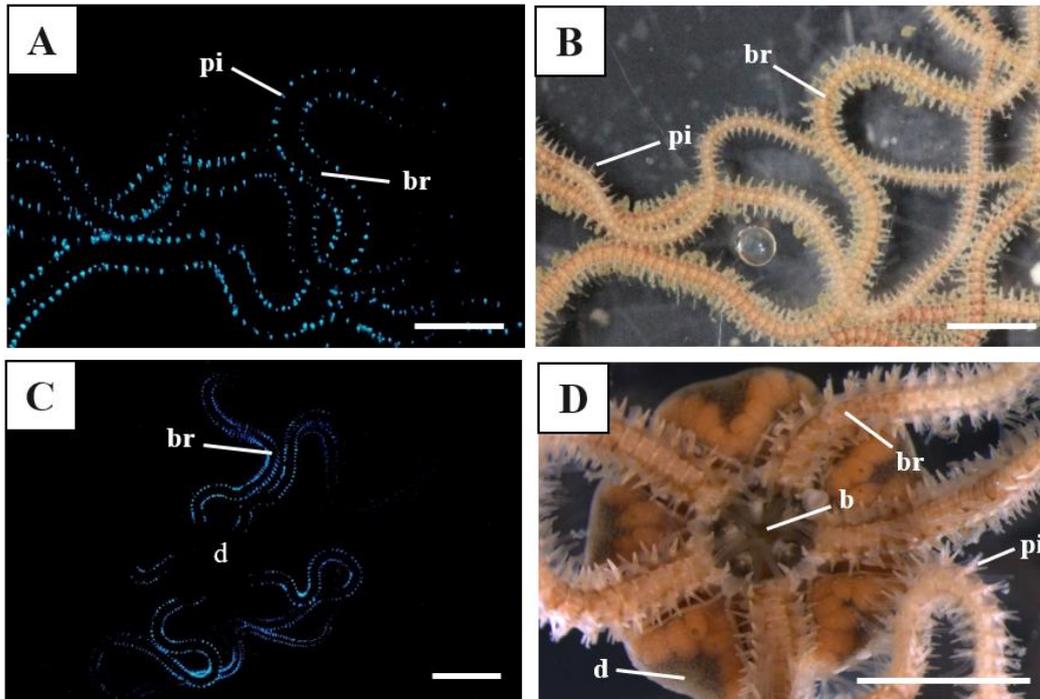
**Figure 3.9 :** Résultats de l'amplification d'ADNc de gènes de luciférase à partir d'un extrait de bras d'ophiure.

L'analyse montre que les 6 gènes testés sont exprimés au sein des tissus de l'ophiure et les poids moléculaires observés correspondent aux poids moléculaires prédits par le programme AmplifX, qui a permis le design des amorces pour l'amplification des gènes. Les gènes présentant une bande plus intense, attestant d'un niveau d'expression plus élevé, sont les gènes AF10707 et AF24528.

## **3.2 Bioluminescence et expression de la luciférase chez *A. filiformis***

### **3.2.1 Bioluminescence chez *A. filiformis***

Des photos de la bioluminescence ont été capturées afin d'apporter plus de précisions aux données déjà disponibles et publiées par le Professeur Jérôme Malfet et le Dr. Jérôme Delroisse (e.g., Delroisse *et al.*, 2017b). De nouvelles images ont été prises en vue orale afin de compléter les données disponibles pour la face aborale. La bioluminescence chez *A. filiformis* se manifeste au niveau des bras de l'ophiure, précisément au niveau des piquants portés par ces bras et de l'extrémité du bras (Delroisse *et al.*, 2017b).



**Figure 3.10** : Bioluminescence provoquée par stimulation mécanique chez *A. filiformis*. (A-B) En vue aborale (Echelle :0,5cm). (C-D) En vue orale (Echelle :1 cm ; 0,5 cm). (B-D) Avant stimulation. (A-C) Pendant la stimulation. \*Légende : b-bouche ; br-bras ; d-disque ; pi-piquant.\* Photos A et C : Jérôme Delroisse.

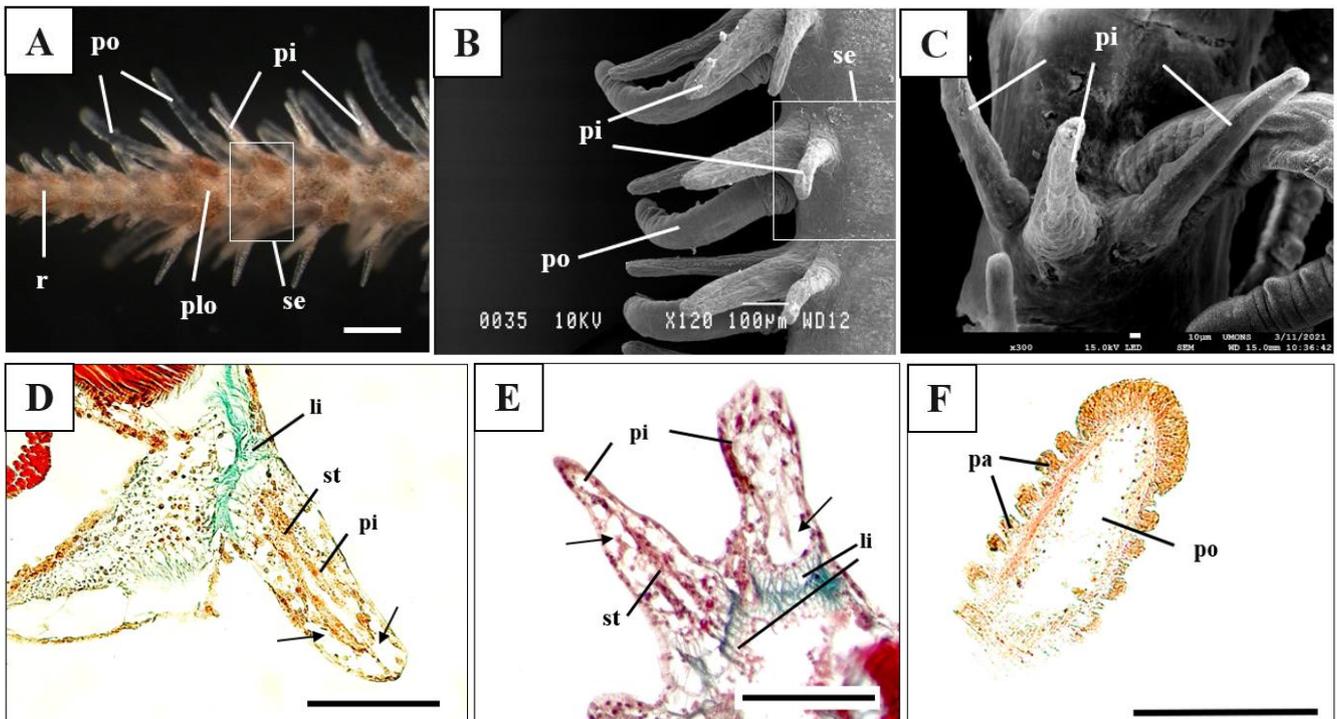
Les photos montrent l'émission de lumière bleue au niveau des piquants des bras de l'ophiure et l'émission est visible à la pointe des piquants (**Fig.3.10A-C**). En cela, nos résultats confirment les études antérieures. Les clichés en vue orale confirment l'absence d'émission en dehors des piquants. Tous les piquants semblent être lumineux, mis à part les piquants portés par les portions de bras présentes sous le disque (**Fig.3.10C-D**).

### **3.2.2 Microscopie et histologie**

L'étude de l'émission de lumière et de l'expression de la luciférase demande une bonne connaissance de l'anatomie de l'organisme étudié afin de pouvoir reconnaître les structures d'intérêt. Des observations à la loupe binoculaire (**Fig.3.10A**), au microscope électronique à balayage (SEM) (**Fig. 3.10B-C**) et des colorations de coupes histologiques au Trichrome de Masson (Gabe, 1968), (**Fig. 3.10D-F**) ont alors été effectuées sur des bras d'*A. filiformis*.

Comme l'émission de lumière a été détectée au niveau du bras, c'est principalement cette structure qui est étudiée. Chaque bras est constitué d'une suite de segments (**Fig.3.11.A**) soutenus par 4 pièces squelettiques externes (plaque orale, plaque aborale, plaques latérales) et une "vertèbre interne". Chacun des segments porte une paire de podia positionnée sur la face orale et 3 à 6 piquants sur chaque plaque latérale. Deux morphotypes de piquant sont observés: l'un est long et effilé (**Fig.3.11C**) et l'autre présente une extrémité élargie (**Fig.3.11.D**). La

longueur d'un piquant est généralement comprise entre 200 et 300  $\mu\text{m}$ . Les piquants sont articulés sur les plaques latérales par un ligament. A l'intérieur du piquant est présent un ossicule conique et creux, les cellules enchâssées à l'intérieur de celui-ci forment le stroma et les cellules à l'extérieur de celui-ci forment l'épiderme et une couche de cellule sous-épidermique. L'ossicule n'est pas présent sur les coupes histologiques puisque le spécimen a subi une décalcification préalable.



**Figure 3.11** : Anatomie d'un bras d'*A. filiformis*. (A-C) Anatomie externe. (D-F) Anatomie interne. (A) Vue ventrale (Echelle : 300  $\mu\text{m}$ ). (B-C) Vue latérale (Echelle : 100  $\mu\text{m}$  ; 10 $\mu\text{m}$ ). (D-E) Coupes longitudinales dans les piquants (Echelle : 100 $\mu\text{m}$ ). (F) Coupe longitudinale dans un podion (Echelle : 100 $\mu\text{m}$ ). \*Légende : li-ligament ; pa-papille ; plo-plaque orale ; po – podion ; pi – piquant ; r-régénérat ; se-segment ; st-stroma. Les flèches désignent la position de l'ossicule du piquant (non présent après décalcification).\*

### 3.2.3 Expression de la luciférase chez *A. filiformis*

Des immunohistochimies ont été réalisées pour immunolocaliser la luciférase et caractériser son profil d'expression. Nos investigations se sont axées (i) sur le lieu d'expression et (ii) sur la dynamique d'expression. Les expériences d'immunofluorescence ont donc été réalisées sur des organismes fixés sans qu'il y ait eu émission de lumière (c.à.d., préalablement anesthésiés au  $\text{MgCl}_2$ ) mais aussi sur des organismes fixés directement après émission de la bioluminescence (c.à.d., anesthésiés au  $\text{MgCl}_2$  puis stimulés au KCl ou à l'acétylcholine).

Des immunohistochimies ont également été réalisées pour l'opsine-c, une protéine sensible à la lumière, qui s'est avérée être co-localisée avec la luciférase (Delroisse *et al.*, 2014).

Il s'agissait de visualiser la localisation de l'opsine-c au sein des tissus et d'établir un éventuel lien avec l'expression de la luciférase.

Aussi, les expériences ont été réalisées chez une espèce non lumineuse, *Ophiura albida*, afin de comparer l'expression de ces deux protéines chez une espèce non lumineuse et de mieux comprendre le rôle de l'opsine-c dans la bioluminescence.

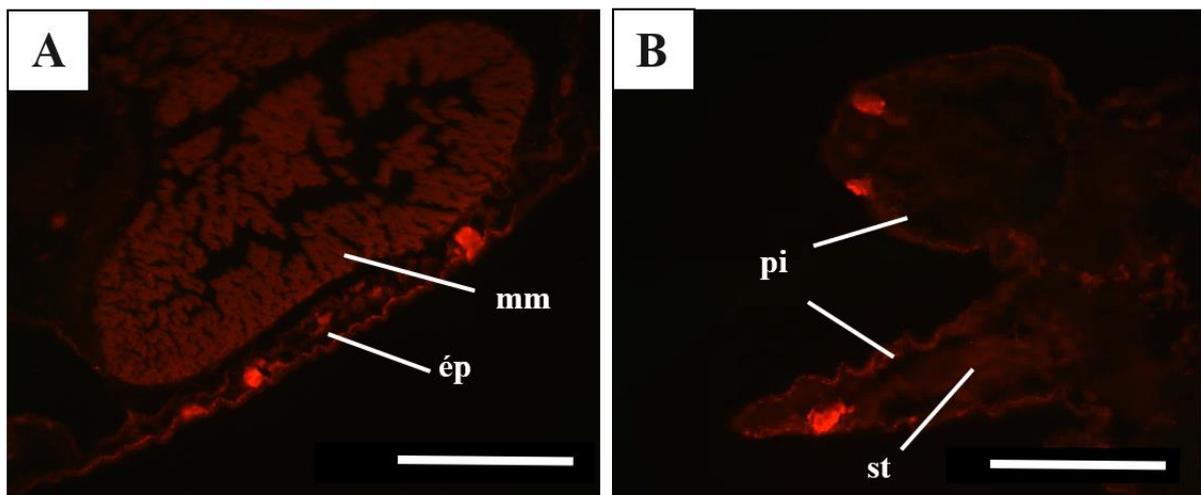
### 3.2.3.1 Immunodétection de la luciférase

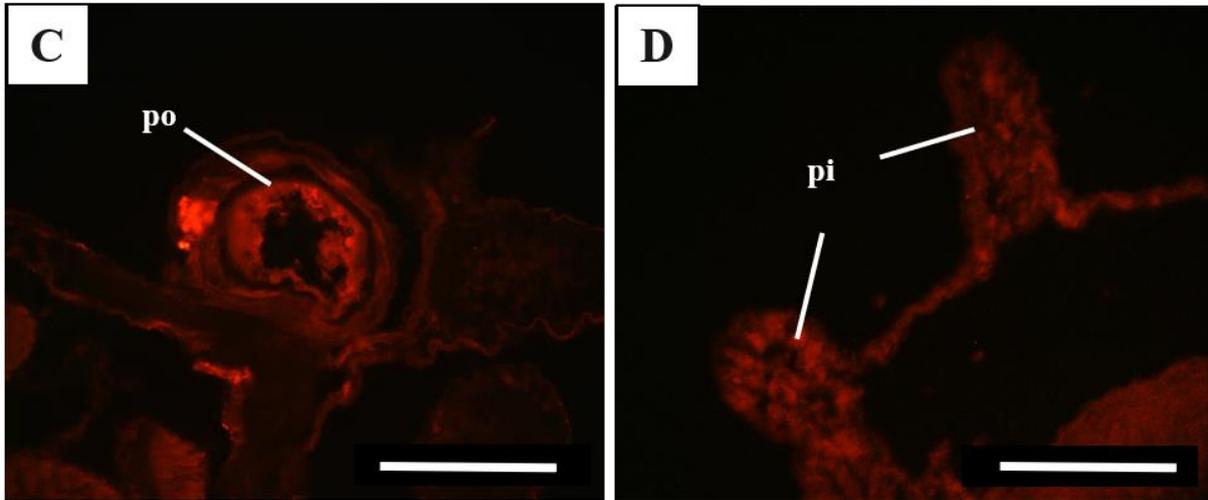
Des immunofluorescences ont été exécutées sur coupes et in toto (c.à.d., sur des fragments de l'organisme entier). Deux anticorps commerciaux différents, dirigés contre la luciférase de *Renilla reniformis*, ont été utilisés. Chacun de ceux-ci est dirigé contre une zone distincte de la protéine (Anti-Rluc A : entièreté de la protéine ; Anti-Rluc C : région N-terminale de la protéine)

#### 3.2.3.1.1 Immunodétection sur coupe

##### A. Immunodétection avec l'anticorps Anti-Rluc A

L'anticorps Anti-Rluc A appliqué sur les coupes transversales de bras d'*A. filiformis* a marqué diverses structures. On retrouve du marquage au niveau des piquants : dans le stroma (non présenté) ainsi qu'en bordure de celui-ci, au niveau de la couche sous-épidermique du piquant (**Fig.3.12B**). Du marquage a également été observé au niveau de l'épiderme du bras (**Fig.3.12.A**) et des podia (**Fig.3.12C, Tableau 3.3**). Dans tous les cas, le marquage apparaît localisé. Le contrôle, pour lequel l'anticorps primaire n'a pas été appliqué dans le but de s'assurer que l'anticorps secondaire ne se lie à aucune autre protéine, ne présente aucun marquage. Chez *O. albida*, l'ophiure non lumineuse, aucun marquage n'a été observé (**Fig.3.12.D**).

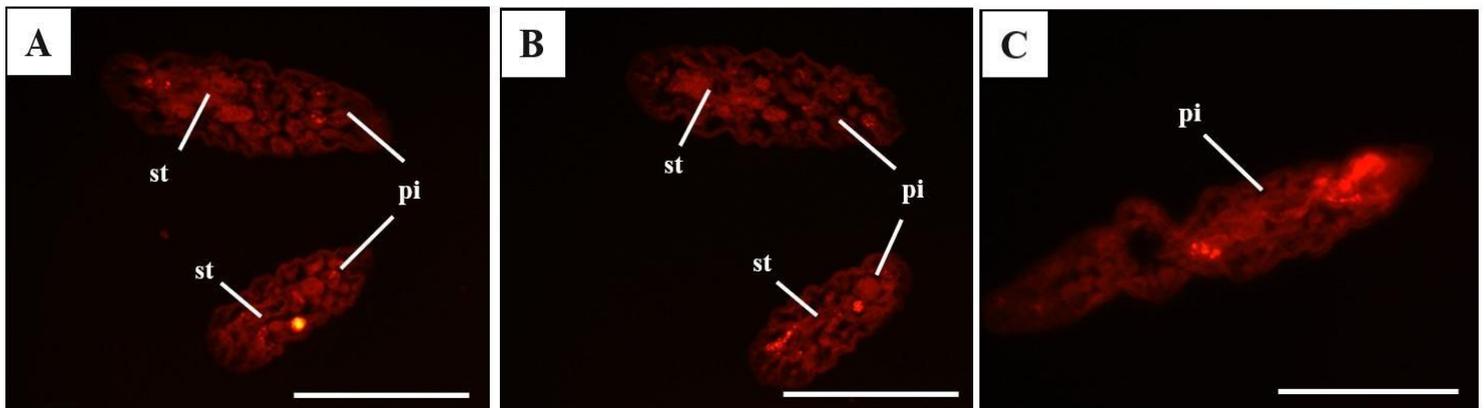


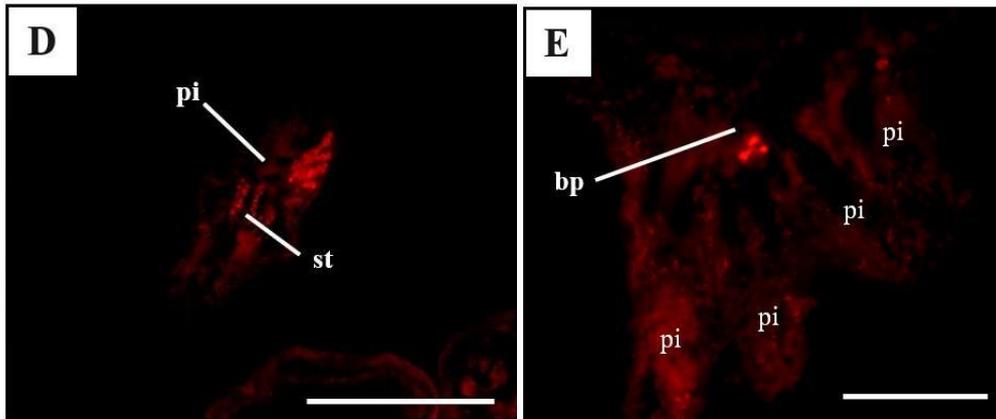


**Figure 3.12** : Immunodétection de RLucA sur coupe transversale de bras d'*A. filiformis* (A-C) et d'*O. albida* (D). Marquage (A) au niveau de l'épiderme. (B) en bordure des piquants en coupe longitudinale. (C) au niveau d'un podia en coupe transversale. (D) Absence de marquage au niveau des piquants. \*Légende : ép-épiderme ; mm-massif musculaire ; pi-piquant ; po-podion ; st-stroma. (Echelle : 100 $\mu$ m).

### B. Immunodétection avec l'anticorps Anti-RLuc C

L'anticorps primaire Anti-RLuc C administré chez *A. filiformis* a induit du marquage au niveau des piquants, et ce pratiquement sur chaque piquant observé (**Fig.3.13**). Le marquage s'est manifesté dans le stroma du piquant (**Fig.3.13A-B,D**) et jusqu'au-delà de l'ossicule, dans la couche sous-épidermique en bordure du piquant (**Fig.3.13C-D**). Du marquage est également visible à la base de certains piquants : sur la **Fig.3.13E**, on observe 3 zones marquées à la base de 4 piquants. Le marquage peut être soit localisé (**Fig.3.13A-B,E**), soit effilé et continu (**Fig.3.13C-D ; Fig.3.13 ; Tableau 3.3**). Le contrôle, sur lequel l'anticorps primaire n'a pas été appliqué, n'a présenté aucun marquage (non présenté).

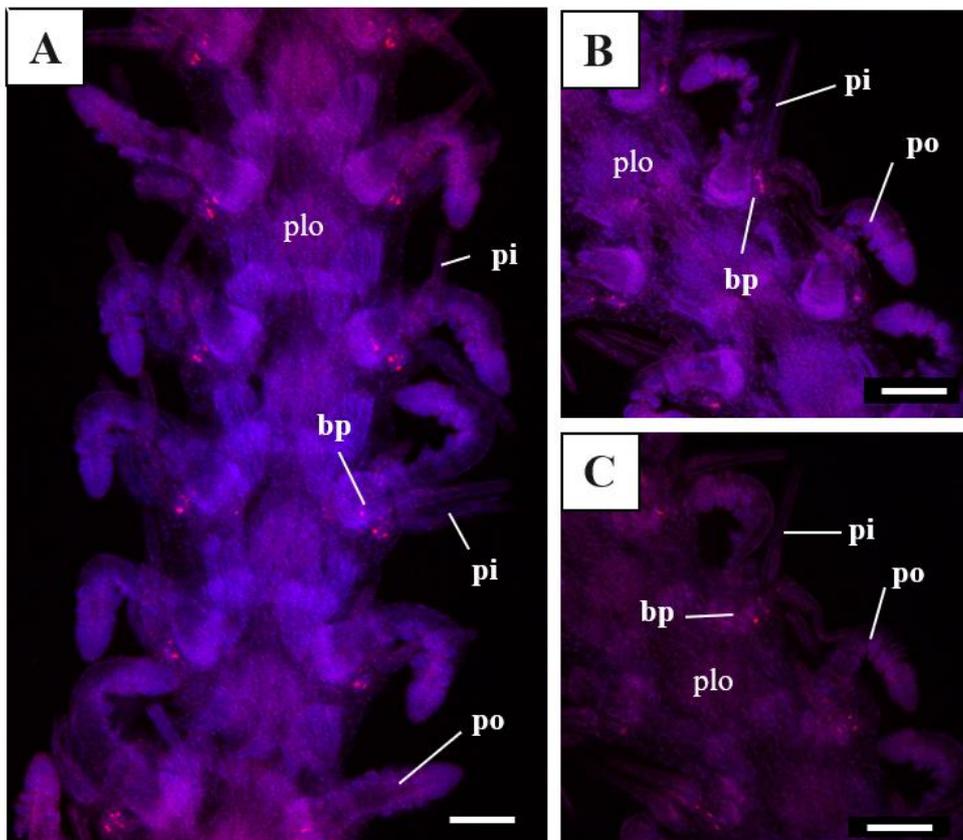




**Figure 3.13 :** Immunodétection de RLuc C sur coupe transversale de bras d'*Amphiura filiformis*. Marquage au niveau (A-D) de piquants en vue longitudinale. (E) de la base de 4 piquants en coupe longitudinale.\*Légende : bp-base du piquant ; pi-piquant ; st-stroma du piquant. Echelle : 100µm\*.

### 3.2.3.1.2 Immunodétection en Whole-Mount

Les résultats de l'immunofluorescence en Whole-Mount effectuée avec l'anticorps Anti-Rluc C montrent un marquage localisé spécifiquement à la base de chaque piquant. Aucun marquage n'a été observé autre part dans le piquant, ni au niveau des podia et de l'épiderme (**Fig.3.14**).



**Figure 3.14 :** Immunodétection en Whole-Mount de RLuc C sur un bras entier d'*Amphiura filiformis* positionné face orale. (A) Vue générale. (B-C) vue rapprochée. \*Légende : bp-base du piquant ; pi-piquant, po-podium ; plo-plaque orale. Echelle : 100 µm\*.

### 3.2.3.2 Etude de la dynamique d'expression de la luciférase

Une partie de l'étude de l'expression de la luciférase est consacrée à la dynamique d'expression. Effectivement, les recherches menées par Delroisse *et al.*, 2017b, ainsi que celles réalisées durant ce mémoire ont montré deux patterns d'expression au sein du piquant : un marquage localisé à la base du piquant et un marquage longiligne traversant le piquant dans sa longueur. En début de projet, nous avons émis l'hypothèse que ces différences de marquage pourraient être liées à des variations d'expression de la luciférase en fonction de la cinétique de la réaction de bioluminescence (c.à.d., avant, pendant, après émission). Nous avons testé l'expression de l'enzyme juste après qu'il l'émission de la lumière. Les organismes ont été stimulés chimiquement (KCl ou acétylcholine) pour enclencher la bioluminescence et puis fixés avant d'être utilisés dans des analyses en immunofluorescence sur coupe et *in toto* avec les anticorps Anti-Rluc A et Anti-Rluc C.

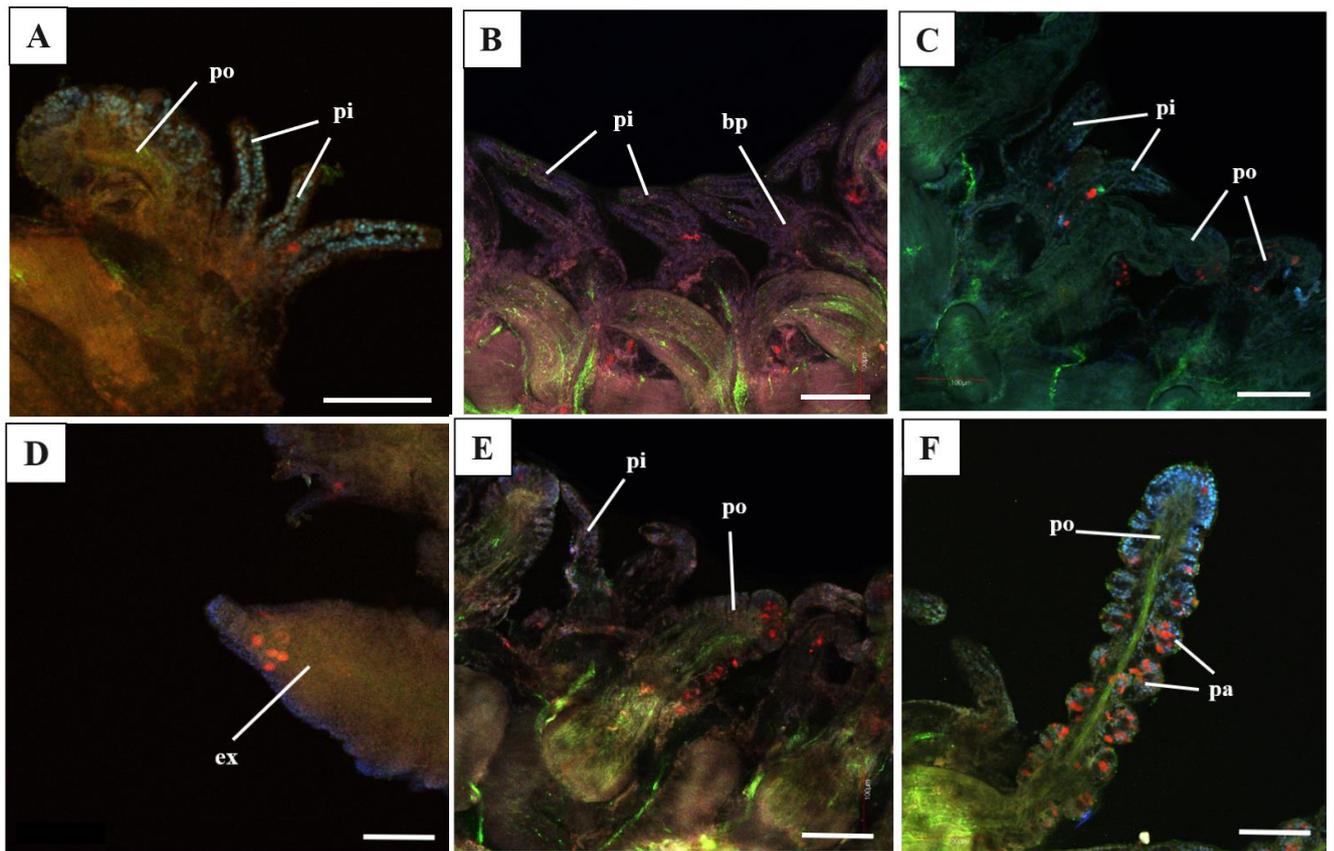
#### 3.2.3.2.1 Immunodétection sur coupe

Aucun marquage n'a été observé en immunofluorescence sur coupe, aussi bien pour le test au KCl, à l'acétylcholine, et pour les échantillons contrôle ; et ce pour les deux anticorps.

#### 3.2.3.2.2 Immunodétection en Whole-Mount

Les analyses en immunofluorescence utilisant l'anticorps Anti-Rluc A sur l'échantillon entier ont montré du marquage au niveau des piquants, ce marquage est localisé à la base des piquants. Du marquage est également présent au niveau des podia, et en particulier au sein des papilles portées par les podia. Ces marquages ont été observés pour les deux traitements ainsi que pour le contrôle (**Fig.3.15B-C,E-F ; Tableau 3.2**). L'échantillon traité au KCl a également montré un marquage au niveau de l'extrémité du bras de l'ophiure (**Fig.3.15D, Tableau 3.2**). Les autres échantillons ne présentaient pas d'extrémité et le marquage avec d'autres anticorps ou d'autres traitements n'a donc pas pu être expérimenté sur des extrémités de bras.

L'application de l'anticorps Anti-RLuc C a également montré du marquage au niveau des piquants pour le traitement à l'acétylcholine et le contrôle (**Fig.3.15A**) mais pas pour le KCl. Un marquage dans les podia a également été observé mais uniquement pour le traitement à l'acétylcholine (**Tableau 3.2**).



**Figure 3.15 :** Immunodétection de RLuc A et C sur des bras d'*Amphiura filiformis*. (A) Stimulation à l'Ach, anticorps Anti-RLuc C. (B,F) Contrôle, anticorps Anti-RLuc A. (C-D) Stimulation au KCl, anticorps Anti-RLuc A. (E) Stimulation à l'Ach, anticorps Anti-RLuc A. Marquage rouge : RLuc A ou C. Marquage bleu : noyaux cellulaires. Marquage vert : tubuline. Légende : bp-base des piquants ; pa-papille ; pi-piquant; po-podion; ex-extrémité du bras (Echelle : 100  $\mu$ m).

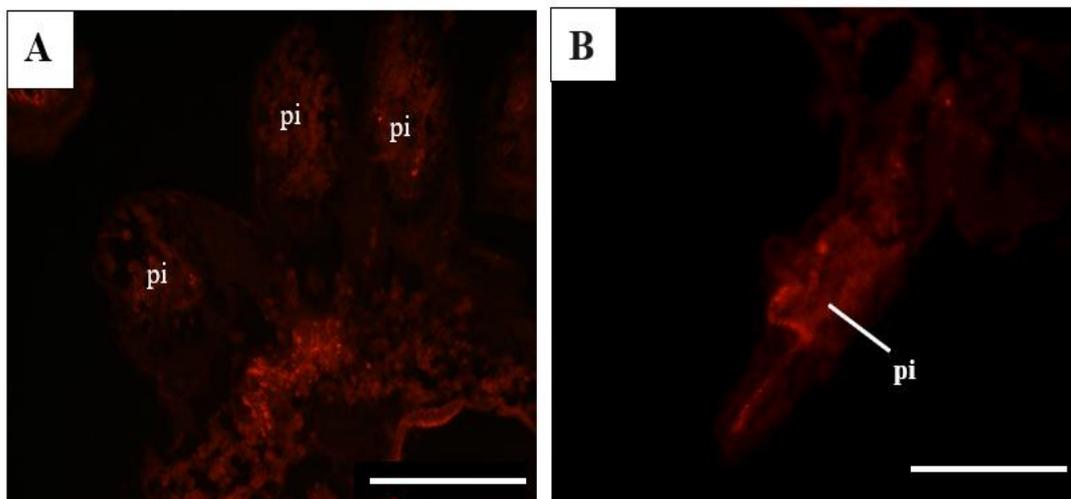
**Tableau 3.2 :** Présence ou absence de marquage luciférase dans diverses structures biologiques selon plusieurs traitements. \*Légende : les « + » indiquent la présence de marquage luciférase, les « - » indiquent l'absence de marquage luciférase, les barres obliques indiquent que la structure n'a pas été observée dans l'échantillon.\*

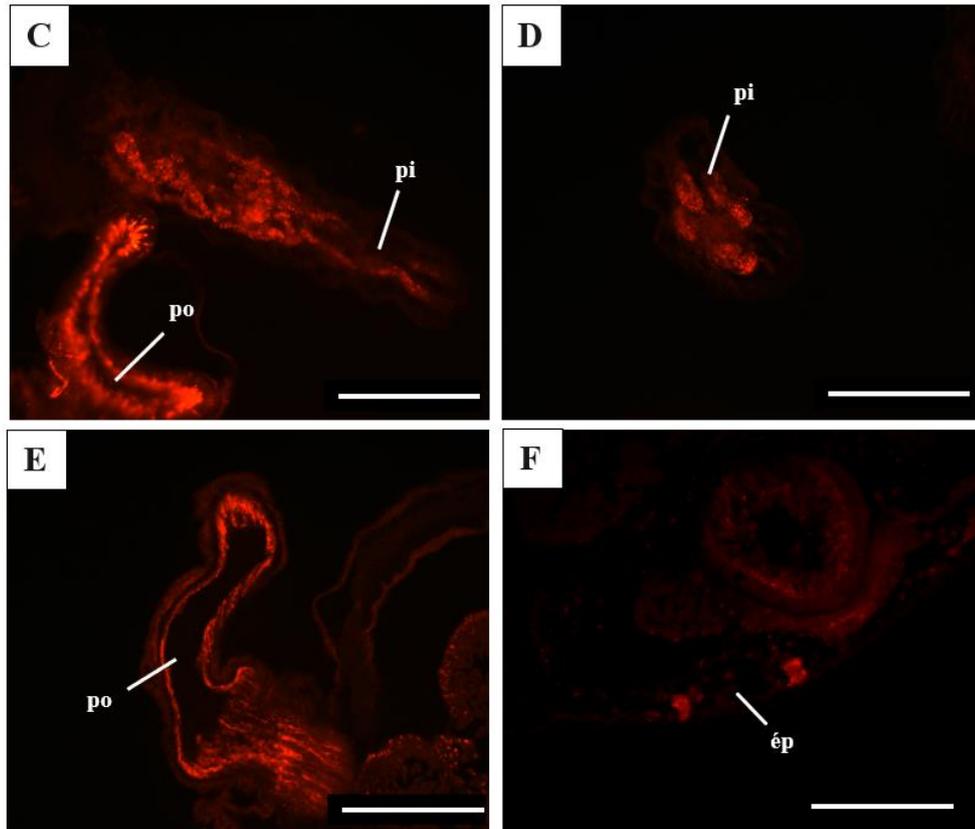
Stimulation de la bioluminescence	Anticorps	Structures marquées		
		Piquants	Podia	Extrémité du bras
KCl	Anti-RLuc A	+	+	+
	Anti-RLuc C	-	-	/
Acétylcholine (Ach)	Anti-RLuc A	+	+	/
	Anti-RLuc C	+	+	/
Contrôle	Anti-RLuc A	+	+	/
	Anti-RLuc C	+	-	/

Suite à ces expériences, on n’observe pas de différence de marquage claire entre les échantillons stimulés et les échantillons “contrôle”. La condition “contrôle” ainsi que la condition “traitement” montrent un marquage au niveau de la base des piquants et au sein des papilles des podia. Cependant, ces marquages ne sont pas retrouvés pour les deux anticorps et pour les deux solutions de stimulation. De plus, les échantillons “contrôle” présentent un marquage encore non rencontré au niveau des podia qui est presque systématique et le marquage dans les piquants, trouvé à de nombreuses reprises dans les expériences d’immunofluorescence sur coupe, est lui beaucoup moins représenté. Ces observations suggèrent un biais expérimental pour ces expériences.

### 3.2.3.3 Etude de l’expression de l’opsine-c

Les résultats d’expériences d’immunohistochimie avec l’anticorps Anti-Opsine C testées chez *A. filiformis* montrent un marquage au niveau de la base des piquants (**Fig.3.16A**), dans le stroma des piquants (**Fig.3.16B-D**), et également au niveau des podia (**Fig.3.16E**) et de l’épiderme (**Fig.3.16F**). Le marquage est plutôt localisé au niveau de l’épiderme (**Fig.3.16F**) mais apparaît plus diffus à la base (**Fig.3.16A**) et au sein des piquants, et semble traverser le piquant dans sa longueur (**Fig.3.16B-C**). Chez *O. albida*, aucun marquage n’a été observé au niveau des piquants, les autres structures n’ont pas pu être observées.





**Figure 3.16 :** Immunodétection de l'opsine-c sur coupes transversales de bras d'*Amphiura filiformis*. Marquage au niveau (A) de la base des piquants en vue longitudinale (B-C) des piquants en vue longitudinale (D) d'un piquant en vue transversale (E) d'un podion en vue longitudinale (F) de l'épiderme. \*Légende : pi-piquant ; po-podion ; ép-épiderme. Echelle : 100  $\mu$ m\*.

**Tableau 3.3 :** Tableau récapitulatif des expériences d'immunodétection de RLuc A, RLuc C et de l'Opsine C sur des échantillons en coupe et en Whole-Mount d'*A. filiformis* et d'*O. albida*. \*Légende : les « + » indiquent la présence de marquage, les « - » indiquent l'absence de marquage, les barres obliques indiquent que la structure n'a pas été observée dans l'échantillon\*.

Espèce	Anticorps	Structures marquées			
		Piquants	Base des piquants	Podia	Epiderme
<i>A. filiformis</i>	Anti-RLuc A	+	-	+	+
	Anti-RLuc C	+	+	-	-
	Anti-Opsine 1.1	+	+	+	+
<i>O. albida</i>	Anti-RLuc A	-	-	-	-
	Anti-Opsine 1.1	-	-	/	/

## 4 DISCUSSION

---

### 4.1 Origine de la bioluminescence chez *A. filiformis*

L'histoire évolutive complexe de la bioluminescence est marquée par l'émergence d'une grande diversité de systèmes et de patterns étonnants de similitudes entre des organismes éloignés phylogénétiquement. Nous prenons ici l'exemple de deux organismes marins bioluminescents : *Renilla reniformis* et *Amphiura filiformis*, respectivement une pensée de mer (Cnidaria, Anthozoa, Pennatulaceae) et une ophiure (Echinodermata, Ophiuroidea), partageant "un même type de luciférase", l'enzyme responsable de la production de lumière. Ces organismes possèdent des gènes de luciférase homologues codant pour des protéines similaires. L'origine évolutive de ces luciférases n'est pas totalement élucidée mais elles dériveraient - par transfert horizontal de gènes - d'enzymes homologues présentes chez les bactéries dont la fonction n'est pas une fonction "luciférasique" mais une fonction haloalkane déhalogénase (Delroisse *et al.*, 2017a). Par ailleurs, des gènes homologues à celui de la luciférase de *Renilla* ont été identifiés chez de nombreux autres métazoaires, mais se sont portés absents dans les groupes basaux des eucaryotes et au sein même de certains groupes métazoaires.

L'incongruité phylogénétique rencontrée encourage l'hypothèse d'un transfert horizontal (Keeling & Palmer, 2008) pour les gènes homologues à la luciférase de *Renilla*. Trois hypothèses ont été émises à ce sujet : la première suggère que le transfert ait eu lieu des bactéries vers l'ancêtre commun des cnidaires et des échinodermes; la seconde suggère un transfert indépendant des bactéries vers les cnidaires et vers les échinodermes; la troisième propose que le transfert aurait eu lieu des bactéries vers un groupe métazoaire et qu'un transfert secondaire aurait permis l'acquisition de ces gènes dans un autre groupe métazoaire (Delroisse *et al.*, 2017a).

L'arbre phylogénétique construit sur base de séquences homologues RLuc/HD d'un large échantillon d'organismes laisse ressortir une phylogénie globale comparable à la phylogénie classique des métazoaires et des bactéries. Cependant, l'embranchement des échinodermes présente une topologie encore non rencontrée dans les phylogénies classiques : les regroupements par classe sont conservés mais les ophiuroïdés, crinoïdés et astéroïdés forment un groupe monophylétique avec les urochordés et les échinozoaires (oursins et holothuries) en

forment également un avec les anthozoaires. La recherche de séquences homologues montre qu'aucun gène homologue à celui de la luciférase RLuc n'a été identifié dans les groupes basaux des eucaryotes, ce qui laisse un espace béant entre les groupes métazoaires et bactériens dans la phylogénie et rend possible un transfert horizontal des bactéries à la base des métazoaires. L'absence de ce gène chez de nombreux organismes métazoaires s'expliquerait alors par une perte du gène au cours de l'évolution de la lignée. L'hypothèse d'un transfert de gènes des bactéries vers les métazoaires est également soutenue par l'analyse de la structure des gènes, celle-ci montre que chez la majorité des espèces échinodermes et cnidaires possédant des gènes homologues à celui de RLuc, ces gènes ne présentent pas d'introns. Chez les échinodermes, seuls les oursins et les concombres de mer ont des gènes pourvus d'introns et chez les cnidaires, un unique intron apparaît dans un des gènes de *Dendronephthya gigantea*. L'absence d'introns dans le génome étant caractéristique des bactéries, un transfert horizontal de gènes bactériens est suspecté dans ces groupes. Cependant, la présence ou l'absence d'introns est variable selon les groupes et ne permet pas de mettre en évidence un pattern clair. Il en est de même pour l'analyse du sens des gènes. Ces observations décrivent une grande variabilité et une évolution moléculaire complexe.

D'après les recherches phylogénétiques et la description de la structure des gènes, on constate que la première hypothèse, à savoir un transfert horizontal des bactéries vers l'ancêtre des métazoaires, est plausible étant donné la présence de ces gènes dans de nombreux groupes métazoaires. La deuxième hypothèse, suggérant un transfert chez les cnidaires et les bactéries indépendamment, n'est pas confirmée par ces analyses puisqu'aucun des groupes cnidaire ou échinoderme n'est retrouvé à proximité des bactéries dans cette phylogénie. Cela est également visible à travers les analyses de similarité par rapport à RLuc et par rapport à HD : on constate que les échinodermes n'ont pas une similarité plus importante par rapport à HD que les anthozoaires. La troisième hypothèse, celle d'un transfert horizontal de gènes entre groupes métazoaires, n'est pourtant pas à écarter puisque l'embranchement des cnidaires, positionné dans une phylogénie classique à la base des métazoaires, est ici associé à l'embranchement des échinodermes.

Les hypothèses évolutives se tournent aussi vers la cooptation, proposant une cooptation de gènes d'haloalkane déhalogénase en gènes de luciférase. À travers les analyses de similarité par rapport à RLuc et à HD, il est ressorti que les séquences des protéines homologues RLuc/HD avaient une valeur de similarité semblable avec RLuc ou avec HD, et ce même pour *A. filiformis*, l'espèce lumineuse étudiée. Cela indique qu'il est difficile de distinguer les deux

types d'enzymes. C'est également perceptible dans l'arbre phylogénétique, où les cnidaires et les échinodermes sont rassemblés dans un groupe monophylétique. De plus, l'analyse de clustering montre peu de regroupement des séquences luciférase entre elles, et surtout des haloalkane déhalogénases entre elles, indiquant une certaine diversité de ces séquences et impliquant une difficulté à les distinguer.

Une recherche plus poussée, menée principalement sur les séquences d'*A. filiformis*, s'est intéressée au site actif des deux enzymes. D'abord, le site actif de ces enzymes est identique, c'est-à-dire composé des mêmes acides aminés (Woo *et al.*, 2008 ; Chaloupkova *et al.*, 2019). Ensuite, une étude (Chaloupkova *et al.*, 2019) avait montré que le passage de l'acide aminé Ala (alanine), voisin d'un des résidus du site actif en Pro (proline) chez une enzyme artificielle à fonction luciférase provoque un shift vers la fonction haloalkane déhalogénase, diminuant considérablement la fonction luciférase. Les séquences d'*A. filiformis* ont alors été examinées au niveau de ces résidus. Les résultats montrent de nouveau la difficulté à distinguer une enzyme luciférase d'une enzyme HD. Effectivement, alors que l'acide aminé Ala semblait annoncer la présence d'une fonction luciférase, il s'est avéré que toutes les séquences d'*A. filiformis* ont présenté une proline à cet endroit, or cette espèce est lumineuse. De plus, Pyroluc, l'enzyme luciférase détectée chez l'urochordé lumineux *Pyrosoma atlanticum* et dont la fonction luciférase a été testée biochimiquement (Tessler *et al.*, 2020), possède aussi une proline à cet endroit. Ceci montre que la nature de cet acide aminé ne suffit pas à distinguer les deux enzymes. Les résultats fournis par l'ensemble de ces recherches suggèrent une potentielle bifonctionnalité de ces enzymes. Il reste à savoir comment cette bifonctionnalité est exprimée. On peut se demander si le substrat, ici la coelentérazine, est limitant pour que la fonction luciférase s'active. Des recherches à ce sujet (Delroisse *et al.*, 2017a) ont été menées sur *Asterias rubens*, une espèce d'étoile de mer à priori non lumineuse, et ont révélé que l'ajout de coelentérazine n'était pas suffisant pour provoquer une fonction luciférase chez la protéine. Cette hypothèse est alors à écarter et il semblerait que la distinction entre les deux fonctions soit encore plus subtile, celle-ci pourrait relever par exemple de conditions changeantes. La bifonctionnalité de ce type d'enzyme a été observée chez la luciférase de lucioles, qui peut exercer également la fonction acétyl-CoA synthase dans certaines conditions (Oba *et al.*, 2003). Pour Rees *et al.*, 1998, il est clair que l'évolution de la luciférase est dépendante de la luciférine, et il a été montré par Vassel *et al.*, 2012, que la coelentérazine réagit et permet la production de lumière rapidement lorsqu'elle est mise en contact avec une protéine présentant un site actif

particulier. Ainsi, l'hypothèse de la bifonctionnalité de l'enzyme luciférase est plausible quand on estime qu'une spécificité relative relie l'enzyme et son substrat.

Par ailleurs, l'acquisition de la fonction luciférase chez ces deux organismes en particuliers, à savoir l'échinoderme *A. filiformis* et le cnidaire *R. reniformis*, n'est peut-être pas anodine. On observe notamment une similitude au niveau de l'écologie des deux espèces bien qu'elles ne partagent pas la même zone géographique. En outre, *Pennatulula phosphorea* (Linnaeus, 1758), une autre plume de mer (Cnidaria, Anthozoa, Pennatulaceae), a été observée en sympatrie avec *A. filiformis*. Celle-ci présente un système lumineux comparable à celui de *R. reniformis*. Ces deux espèces vivent dans le sédiment boueux des fonds marins et sont suspensivores. Se nourrissant des mêmes éléments, on peut suggérer une acquisition trophique de la luciférine dans les deux cas. Même si aucune recherche n'a été menée à ce jour chez *P. phosphorea*, cette hypothèse a cependant été prouvée pour *A. filiformis* (Mallefet *et al.*, 2020). Cette connexion spatiale et biologique entre deux organismes lumineux s'avère relativement intéressante quand on sait que *R. reniformis* et *A. filiformis* partagent une luciférase homologue (Delroisse *et al.*, 2017a), et suggère l'implication de pressions sélectives identiques chez les deux organismes, donnant éventuellement lieu à un événement d'évolution parallèle. Par ailleurs, ces observations ainsi que les données phylogénétiques mettent en évidence une relation étroite entre certains cnidaires et certains échinodermes, ce qui pourrait favoriser un transfert horizontal entre métazoaires (Keeling, 2009) et soutenir la troisième hypothèse évolutive. Si cette hypothèse est retenue, les données suggèrent plutôt un transfert des échinodermes vers les cnidaires puisque seule la classe des Anthozoaires présente le gène de luciférase chez les cnidaires, alors qu'il est retrouvé dans les 5 classes échinodermes. À ce stade, l'hypothèse de transferts multiples, à la base des métazoaires et chez les échinodermes, n'est pas rejetée.

## **4.2 Manifestation de la bioluminescence chez *A. filiformis***

Les expériences d'immunofluorescence utilisant les deux anticorps laissent clairement apparaître l'expression de la luciférase au sein des piquants du bras de l'ophiure, mettant ainsi en évidence les photocytes. Ces observations concordent avec les marquages précédemment mis en lumière par Delroisse *et al.*, 2017b, où les photocytes avaient également été localisés dans le piquant, et en particulier à la base du piquant. Par ces expériences, la luciférase a aussi pu être détectée dans le stroma du piquant, c'est-à-dire la partie centrale entourée par l'ossicule, le marquage obtenu semblant traverser le piquant dans toute sa longueur. Ces observations

suggèrent que les photocytes sont des cellules allongées dont les processus peuvent s'étendre de la base à l'extrémité du piquant comme proposé dans Delroisse *et al.*, 2017b et précédemment Buchanan, 1963. Les analyses sur coupe et en Whole-Mount ont également permis de mettre en évidence la présence de plusieurs photocytes au sein d'un même piquant.

L'immunofluorescence en Whole-Mount a également montré un marquage luciférase spécifique à l'extrémité du bras de l'ophiure. Ces observations corroborent les résultats obtenus par Delroisse *et al.*, 2017b. Ces résultats semblent indiquer la présence de nombreux photocytes concentrés à l'extrémité du bras et des observations de la bioluminescence *in vivo* révèlent une intensité de lumière plus forte à cet endroit (Delroisse *et al.*, 2017b).

Quand on se rapporte aux clichés de la bioluminescence de l'ophiure (**Fig.1.7**), on observe des points lumineux à l'extrémité de chaque piquant ainsi qu'à l'extrémité du bras et aucun marquage n'a été observé au niveau du disque (Buchanan, 1963 ; Delroisse *et al.*, 2017b). Bien que le marquage soit attendu à l'extrémité du piquant, il est localisé à la base et le long de celui-ci. Les questions autour des différences entre le marquage observé et la lumière émise restent ouvertes mais une piste pourrait être envisagée : au niveau cellulaire, chez les ophiures, le système bioluminescent est uniquement composé de photocytes et aucune structure accessoire pouvant prétendre à la présence d'un photophore n'a été clairement identifiée jusqu'ici (Delroisse *et al.*, 2017b). Cependant, le marquage observé ajouté à des études sur l'ultrastructure de l'ossicule du piquant laissent penser que l'ossicule jouerait un rôle de guide d'ondes lumineuses de la base du piquant jusqu'à l'extrémité de celui-ci (Delroisse *et al.*, 2017b). Une organisation similaire a notamment été suggérée chez l'éponge *Suberites domuncula* (Müller *et al.*, 2008). Cette nouvelle observation pourrait alors prédire la présence de structures plus complexes participant à l'émission de la lumière, jusque-là non envisagées chez les ophiures.

L'anticorps dirigé contre l'opsine-c a donné des marquages similaires à ceux décrits dans Delroisse *et al.*, (2014) et ont permis eux aussi de localiser les photocytes, présentant un pattern de marquage semblable à celui de la luciférase, ce qui confirme le caractère allongé des cellules émettrices de lumière. La co-localisation de la luciférase et de l'opsine-c a donc été confirmée à travers cette étude. Les opsines étant des protéines photosensibles, cela voudrait dire que la lumière perçue par ces opsines est la bioluminescence générée par l'organisme et non la lumière ambiante. Dès lors, on se questionne sur un potentiel rôle des opsines dans le contrôle de la bioluminescence, rôle qui pourrait avoir une action directe puisque les deux protéines sont

exprimées dans les mêmes cellules. L'hypothèse d'un contrôle de la bioluminescence via un canal photosensible est réaliste puisqu'il a été documenté chez d'autres espèces. C'est par exemple le cas chez le calmar *Euprymna scolopes*, chez qui des opsines ont été localisées au niveau de l'organe lumineux et sont tenues pour responsables du contrôle de la bioluminescence (Tong *et al.*, 2009). Dans notre cas, le contrôle de la bioluminescence est nerveux (Dewael & Mallefet, 2002 ; Mallefet, 2009) mais cela n'empêche pas un contrôle plus direct impliquant les opsines.

Un marquage au niveau des podia et de l'épiderme a été observé à plusieurs reprises, mais pas systématiquement, et ce pour les anticorps Anti-RLuc A et Anti-Opsine C, ces marquages sont inattendus notamment parce que ce type de marquage n'a pas été relevé dans les précédentes études, et parce que la bioluminescence observée se manifeste uniquement au niveau du piquant, et non au niveau des podia et de l'épiderme. Néanmoins, un marquage de ce type pourrait être le résultat de conditions changeantes dans la biologie de l'organisme. De plus, une enzyme homologue à la luciférase de *Renilla* a été trouvée au niveau des podia chez *Asterias rubens*, même si cette enzyme n'a pas réagi avec la coelentérazine (Delroisse *et al.*, 2017a). Ces observations additionnées à l'hypothèse de la bifonctionnalité de l'enzyme amorce l'idée que les anticorps utilisés pourraient mettre en évidence une protéine homologue à la luciférase mais qui exerce une fonction différente.

## 5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES FUTURES

---

Ce mémoire a été consacré à l'étude de l'histoire évolutive et de l'expression de la luciférase de l'ophiure lumineuse *A. filiformis*.

Une protéine homologue à la luciférase de *Renilla reniformis*, un cnidaire lumineux, a été trouvée chez l'ophiure *A. filiformis*. Les recherches à ce sujet, initiées par Delroisse et al. (2017a) et poursuivies à travers ce mémoire, suggèrent que la présence d'enzymes homologues chez ces deux espèces pourtant éloignées phylogénétiquement serait le résultat d'un transfert horizontal de gènes provenant des bactéries. Le transfert aurait eu lieu des bactéries vers l'ancêtre commun des métazoaires et aurait été perdu dans de nombreux phyla. Une autre hypothèse évoque un second transfert, cette fois des échinodermes vers les cnidaires. Sachant que ce gène bactérien code pour une enzyme ayant une fonction haloalkane déhalogénase et non luciférase, il a été précédemment suggéré que des événements de cooptation auraient pu faire basculer la protéine d'une fonction haloalkane déhalogénase vers une fonction luciférase, indépendamment, chez *R. reniformis* et chez *A. filiformis*. Il est aujourd'hui proposé que l'enzyme aurait plutôt acquis une double fonction (haloalkane déhalogénase et luciférase) chez ces deux organismes, poussée par des pressions sélectives similaires dues à l'environnement, dont la présence de coelentérazine, la luciférine, dans leur alimentation.

Pour conforter ou infirmer cette idée liée à la bifonctionnalité de l'enzyme, la production d'une protéine recombinante pour les différents gènes de luciférase identifiés chez *A. filiformis* permettrait de déterminer la fonction relative à chacun des gènes. De plus, des expériences d'hybridation *in situ*, mettant en évidence les transcrits dans les tissus permettraient de savoir si une expression différenciée des gènes a lieu selon le tissu, aidant à la compréhension de la fonction associée à chaque gène.

Les expériences d'immunodétection de la luciférase chez *A. filiformis* ont permis de confirmer l'expression de la luciférase au niveau des piquants de l'ophiure, les structures émettrices de lumière. Précisément, l'expression a été identifiée à la base des piquants et au sein des processus cellulaires qui s'étendent jusqu'à l'extrémité de ceux-ci, ce qui appuie l'idée de la présence de photocytes allongés décrits par Delroisse et al. (2017b). L'expression de la luciférase a également été localisée à l'extrémité du bras, de surcroît avec un grand nombre de

photocytes identifiés. Néanmoins un examen plus poussé sur le positionnement des photocytes à l'extrémité du bras apporterait de précieuses informations : la microscopie électronique à transmission pourrait constituer un bon outil dans ce cadre.

*A contrario*, les recherches sur l'expression de la luciférase au cours de la réaction de bioluminescence n'ont pas permis d'obtenir une réponse claire sur la dynamique d'expression de l'enzyme au cours du phénomène. Dans ce cadre, des expérimentations complémentaires sont à envisager et une étude avant, pendant et après émission de lumière pourrait être réalisée.

## 6 BIBLIOGRAPHIE

---

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Akaike, H. (1998). Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle. In E. Parzen, K. Tanabe, & G. Kitagawa (Éds.), *Selected Papers of Hirotugu Akaike* (p. 199-213). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1694-0\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1694-0_15)

Bergsten, J. (2005). A review of long-branch attraction. *Cladistics*, 21(2), 163–193. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2005.00059.x>

Bessho-Uehara, M., Francis, W. R., & Haddock, S. H. D. (2020). Biochemical characterization of diverse deep-sea anthozoan bioluminescence systems. *Marine Biology*, 167(8), 114. <https://doi.org/10.1007/s00227-020-03706-w>

Bessho-Uehara, M., Yamamoto, N., Shigenobu, S., Mori, H., Kuwata, K., & Oba, Y. (2020). Kleptoprotein bioluminescence: Parapriacanthus fish obtain luciferase from ostracod prey. *Science Advances*, 6(2), eaax4942. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax4942>

Brehm, P., & Morin, J. G. (1977). LOCALIZATION AND CHARACTERIZATION OF LUMINESCENT CELLS IN OPHIOPSILA CALIFORNICA AND AMPHIPHOLIS SQUAMATA (ECHINODERMATA: OPHIUROIDEA). *The Biological Bulletin*, 152(1), 12-25. <https://doi.org/10.2307/1540723>

Brusca, R. C., Moore, W., & Shuster, S. M. (2016). *Invertebrates* (3d ed.). Oxford University Press.

Buchanan, J. B. (1963). Mucus secretion within the spines of ophiuroid echinoderms. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 141(2), 251–259. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1963.tb01611.x>

Buchanan, J. B. (1964). A comparative study of some features of the biology of amphiuira filiformis and amphiuira chiajei [ophiuroida] considered in relation to their distribution. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 44(3), 565–576. <https://doi.org/10.1017/S0025315400027776>

Campbell, A. (2012). Darwin shines light on the evolution of bioluminescence. *Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence*, 27(6), ii-ii. <https://doi.org/10.1002/bio.2439>

Campbell, A. K., & Herring, P. J. (1990). Imidazolopyrazine bioluminescence in copepods and other marine organisms. *Marine Biology*, 104(2), 219–225. <https://doi.org/10.1007/BF01313261>

Chaloupkova, R., Liskova, V., Toul, M., Markova, K., Sebestova, E., Hernychova, L., Marek, M., Pinto, G. P., Pluskal, D., Waterman, J., Prokop, Z., & Damborsky, J. (2019). Light-emitting dehalogenases: Reconstruction of multifunctional biocatalysts. *ACS Catalysis*, 9(6), 4810–4823. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b01031>

Chernomor, O., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2016). Terrace aware data structure for phylogenomic inference from supermatrices. *Systematic Biology*, 65(6), 997–1008. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syw037>

Czarkwiani, A., Ferrario, C., Dylus, D., Sugni, M., & Oliveri, P. (2016). Skeletal regeneration in the brittle star *Amphiura filiformis*. *Frontiers in Zoology*, *13*, 18. <https://doi.org/10.1186/s12983-016-0149-x>

Deheyn, D., Mallefet, J., & Jangoux, M. (2000). Expression of bioluminescence in Amphipholis squamata (Ophiuroidea : Echinodermata) in presence of various organisms: a laboratory study. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *80*(1), 179–180. <https://doi.org/10.1017/S0025315499001733>

Delroisse, J., Duchatelet, L., Flammang, P., & Mallefet, J. (2021). Leaving the dark side? Insights into the evolution of Luciferases. *Frontiers in Marine Science*, *8*, 690. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.673620>

Delroisse, J., Ullrich-Lüter, E., Blaue, S., Ortega-Martinez, O., Eeckhaut, I., Flammang, P., & Mallefet, J. (2017a). A puzzling homology : A brittle star using a putative cnidarian-type luciferase for bioluminescence. *Open Biology*, *7*(4), 160300. <https://doi.org/10.1098/rsob.160300>

Delroisse, J., Ullrich-Lüter, E., Blaue, S., Eeckhaut, I., Flammang, P., & Mallefet, J. (2017b). Fine structure of the luminous spines and luciferase detection in the brittle star *Amphiura filiformis*. *Zoologischer Anzeiger*, *269*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.icz.2017.05.001>

Delroisse, J., Ullrich-Lüter, E., Ortega-Martinez, O., Dupont, S., Arnone, M.-I., Mallefet, J., & Flammang, P. (2014). High opsin diversity in a non-visual infaunal brittle star. *BMC Genomics*, *15*(1), 1035. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1035>

Dewael, Y., & Mallefet, J. (2002). Luminescence in ophiuroids (Echinodermata) does not share a common nervous control in all species. *Journal of Experimental Biology*, *205*(6), 799–806. <https://doi.org/10.1242/jeb.205.6.799>

Dupont, S., & Thorndyke, M. C. (2006). Growth or differentiation? Adaptive regeneration in the brittlestar *Amphiura filiformis*. *The Journal of Experimental Biology*, *209*(Pt19), 3873–3881. <https://doi.org/10.1242/jeb.02445>

Federhen, S. (2012). The NCBI Taxonomy database. *Nucleic Acids Research*, *40*(D1), D136–D143. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1178>

Fortova, A., Sebestova, E., Stepankova, V., Koudelakova, T., Palkova, L., Damborsky, J., & Chaloupkova, R. (2013). DspA from *Strongylocentrotus purpuratus* : The first biochemically characterized haloalkane dehalogenase of non-microbial origin. *Biochimie*, *95*(11), 2091–2096. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.07.025>

Francis, W. R., & de Vilar, A. S. (2020). Bioluminescence and fluorescence of three sea pens in the north-west Mediterranean sea [Preprint]. *Ecology*. <https://doi.org/10.1101/2020.12.08.416396>

Frickey, T., & Lupas, A. (2004). CLANS : A Java application for visualizing protein families based on pairwise similarity. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *20*(18), 3702–3704. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth444>

Gabe, M. (1968). *Techniques histologiques*. Paris: Masson.

Gimenez, G., Metcalf, P., Paterson, N. G., & Sharpe, M. L. (2016). Mass spectrometry analysis and transcriptome sequencing reveal glowing squid crystal proteins are in the same superfamily as firefly luciferase. *Scientific Reports*, 6, 27638. <https://doi.org/10.1038/srep27638>

Grober, M. S. (1988). Brittle-star bioluminescence functions as an aposematic signal to deter crustacean predators. *Animal Behaviour*, 36(2), 493–501. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(88\)80020-4](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(88)80020-4)

Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>

Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52(5), 696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>

Gascuel, O. (1997). BIONJ : An improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, 14(7), 685–695. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025808>

Haddock, S. H. D., Moline, M. A., & Case, J. F. (2010). Bioluminescence in the Sea. *Annual Review of Marine Science*, 2(1), 443–493. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120308-081028>

Haddock, S., & Case, J. (1999). Bioluminescence spectra of shallow and deep-sea gelatinous zooplankton: Ctenophores, medusae and siphonophores. *Marine Biology*, 133, 571–582. <https://doi.org/10.1007/s002270050497>

Hall, T.A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.

Hall, T.A. (2011). Bioedit: An important software for molecular biology. *Gerf bulletin of bioscience*, 2(1), 60–61.

Hart, R. C., Matthews, J. C., Hori, K., & Cormier, M. J. (1979). Renilla reniformis bioluminescence: Luciferase-catalyzed production of nonradiating excited states from luciferin analogues and elucidation of the excited state species involved in energy transfer to Renilla green fluorescent protein. *Biochemistry*, 18(11), 2204–2210. <https://doi.org/10.1021/bi00578a011>

Harvey, E. N. (1916). The mechanism of light production in animals. *Science*, 44(1128), 208–209. <https://doi.org/10.1126/science.44.1128.208>

Hastings, J. W. (1996). Chemistries and colors of bioluminescent reactions : A review. *Gene*, 173(1), 5–11. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00676-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00676-1)

Heath, T., Hedtke, S., & Hillis, D. (2008). Taxon sampling and accuracy of phylogenetic analyses. *Journal of Systematics and Evolution*, 46. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1002.2008.08016>

Herring, P. J. (1974). New observations on the bioluminescence of echinoderms. *Journal of Zoology*, 172(3), 401–418. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1974.tb04116.x>

Hynková, K., Nagata, Y., Takagi, M., and Damborský, J. (1999). Identification of the catalytic triad in the haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *FEBS letters*, 446(1), 177-181. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00199-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00199-4)

Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service : Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1160-1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>

Ke, H.-M., Lee, H.-H., Lin, C.-Y. I., Liu, Y.-C., Lu, M. R., Hsieh, J.-W. A., Chang, C.-C., Wu, P.-H., Lu, M. J., Li, J.-Y., Shang, G., Lu, R. J.-H., Nagy, L. G., Chen, P.-Y., Kao, H.-W., & Tsai, I. J. (2020). *Mycena* genomes resolve the evolution of fungal bioluminescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(49), 31267–31277. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010761117>

Keeling, P. J. (2009). Functional and ecological impacts of horizontal gene transfer in eukaryotes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 19(6), 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.10.001>

Keeling, P. J., & Palmer, J. D. (2008). Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics*, 9(8), 605–618. <https://doi.org/10.1038/nrg2386>

Kuo, M.-W., Postlethwait, J., Lee, W.-C., Lou, S.-W., Chan, W.-K., & Chung, B. (2005). Gene duplication, gene loss and evolution of expression domains in the vertebrate nuclear receptor NR5A (Ftz-F1) family. *Biochemical Journal*, 389(1), 19–26. <https://doi.org/10.1042/BJ20050005>

Lau, E. S., & Oakley, T. H. (2021). Multi-level convergence of complex traits and the evolution of bioluminescence. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 96(2), 673-691. <https://doi.org/10.1111/brv.12672>

Lefort, V., Longueville, J.-E., & Gascuel, O. (2017). SMS : Smart Model Selection in PhyML. *Molecular Biology and Evolution*, 34(9), 2422–2424. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx149>

Lengerer, B., Algrain, M., Lefevre, M., Delroisse, J., Hennebert, E., & Flammang, P. (2019). Interspecies comparison of sea star adhesive proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1784), 20190195. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0195>

Lengerer, B., Wunderer, J., Pjeta, R., Carta, G., Kao, D., Aboobaker, A., Beisel, C., Berezikov, E., Salvenmoser, W., & Ladurner, P. (2018). Organ specific gene expression in the regenerating tail of *Macrostomum lignano*. *Developmental Biology*, 433(2), 448-460. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.07.021>

Loening, A. M. (2006). Consensus guided mutagenesis of *Renilla* luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein Engineering Design and Selection*, 19(9), 391–400. <https://doi.org/10.1093/protein/gzl023>

Loening, A. M., Fenn, T. D., & Gambhir, S. S. (2007). Crystal structures of the luciferase and green fluorescent protein from *Renilla reniformis*. *Journal of Molecular Biology*, 374(4), 1017–1028. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.09.078>

Loo, L., Jonsson, P., Sköld, M., & Karlsson, Ö. (1996). Passive suspension feeding in *Amphiura filiformis* (Echinodermata Ophiuroidea): Feeding behaviour in flume flow and potential feeding rate of field populations. *Marine Ecology Progress Series*, 139, 143–155. <https://doi.org/10.3354/meps139143>

Lorenz, W. W., McCann, R. O., Longiaru, M., & Cormier, M. J. (1991). Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(10), 4438–4442. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.10.4438>

Mallefet, J. (2009). Echinoderm bioluminescence : Where, how and why do so many ophiuroids glow ?. In: Victor Benno Meyer-Rochow, *Bioluminescence in Focus - A Collection of Illuminating Essays*, Research Singpost, p. 67-83. Retrieved from: <http://hdl.handle.net/2078.1/130799>.

Mallefet, J., Duchatelet, L., & Coubris, C. (2020). Bioluminescence induction in the ophiuroid *Amphiura filiformis* (Echinodermata). *Journal of Experimental Biology*, 223(4). <https://doi.org/10.1242/jeb.218719>

Mazumdar, P. A., Hulecki, J. C., Cherney, M. M., Garen, C. R., & James, M. N. G. (2008). X-ray crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* haloalkane dehalogenase Rv2579. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1784(2), 351-362. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.10.014>

McCapra, F. (1976). Chemical mechanisms in bioluminescence. *Accounts of Chemical Research*, 9(6), 201–208. <https://doi.org/10.1021/ar50102a001>

Morse, V. J. (2013). The regulation and origin of bioluminescence in the hydroid obelia [Phd Thesis, Cardiff University]. Retrieved from: <http://orca.cf.ac.uk/53880/>.

Mortensen, T. (1977). *Handbook of the Echinoderms of the British Isles. In Handbook of the Echinoderms of the British Isles*. Brill (Ed.). Retrieved from: <https://brill.com/view/title/2768>.

Müller, W. E. G., Kasueske, M., Wang, X., Schröder, H. C., Wang, Y., Pisignano, D., & Wiens, M. (2008). Luciferase a light source for the silica-based optical waveguides (spicules) in the demosponge *Suberites domuncula*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(3), 537. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8492-5>

Oba, Y., Ojika, M., & Inouye, S. (2003). Firefly luciferase is a bifunctional enzyme : ATP-dependent monooxygenase and a long chain fatty acyl-CoA synthetase. *FEBS Letters*, 540(1-3), 251–254. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00272-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00272-2)

Priyam, A., Woodcroft, B. J., Rai, V., Moghul, I., Munagala, A., Ter, F., Chowdhary, H., Pieniak, I., Maynard, L. J., Gibbins, M. A., Moon, H., Davis-Richardson, A., Uludag, M., Watson-Haigh, N. S., Challis, R., Nakamura, H., Favreau, E., Gómez, E. A., Pluskal, T., & Wurm, Y. (2019). Sequenceserver : A modern graphical user interface for custom BLAST databases. *Molecular Biology and Evolution*, 36(12), 2922–2924. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz185>

Rees, J. F., de Wergifosse, B., Noiset, O., Dubuisson, M., Janssens, B., & Thompson, E. M. (1998). The origins of marine bioluminescence : Turning oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools. *The Journal of Experimental Biology*, 201(Pt 8), 1211–1221.

Robinson, D. F. (1971). Comparison of labeled trees with valency three. *Journal of Combinatorial Theory, Series B*, 11(2), 105-119. [https://doi.org/10.1016/0095-8956\(71\)90020-7](https://doi.org/10.1016/0095-8956(71)90020-7)

Robison, B., Reisenbichler, K., Hunt, J., & Haddock, S. (2003). Light production by the arm tips of the deep-sea cephalopod *vampyroteuthis infernalis*. *The Biological bulletin*, 205, 102–109. <https://doi.org/10.2307/1543231>

Rosenberg, R., & Lundberg, L. (2004). Photoperiodic activity pattern in the brittle star *Amphiura filiformis*. *Marine Biology*, 145(4), 651–656. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1365-z>

Rosenblum, E. B., Parent, C. E., & Brandt, E. E. (2014). The molecular basis of phenotypic convergence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45(1), 203–226. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-120213-091851>

Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL : An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3381–3385. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg520>

Shimomura, O. (2006). *Bioluminescence : Chemical Principles and Methods*. WORLD SCIENTIFIC (Ed.). <https://doi.org/10.1142/6102>

Sköld, M., & Rosenberg, R. (1996). Arm regeneration frequency in eight species of ophiuroidea (Echinodermata) from European sea areas. *Journal of Sea Research*, 35(4), 353–362. [https://doi.org/10.1016/S1385-1101\(96\)90762-5](https://doi.org/10.1016/S1385-1101(96)90762-5)

Solan, M., & Kennedy, R. (2002). Observation and quantification of in situ animal-sediment relations using time-lapse sediment profile imagery (t-SPI). *Marine Ecology-progress Series - MAR ECOL-PROGR SER*, 228, 179–191. <https://doi.org/10.3354/meps228179>

Stöhr, S., O'Hara, T. D., & Thuy, B. (2012). Global diversity of brittle stars (Echinodermata : Ophiuroidea). *PLOS ONE*, 7(3), e31940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031940>

Tessler, M., Gaffney, J. P., Oliveira, A. G., Guarnaccia, A., Dobi, K. C., Gujarati, N. A., Galbraith, M., Mirza, J. D., Sparks, J. S., Pieribone, V. A., Wood, R. J., & Gruber, D. F. (2020). A putative chordate luciferase from a cosmopolitan tunicate indicates convergent bioluminescence evolution across phyla. *Scientific Reports*, 10(1), 17724. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73446-w>

Tong, D., Rozas, N. S., Oakley, T. H., Mitchell, J., Colley, N. J., & McFall-Ngai, M. J. (2009). Evidence for light perception in a bioluminescent organ. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(24), 9836–9841. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904571106>

Trouillet, F. (2016). *Les spectres d'émission* [Illustration]. [http://accens-lyon.fr/accens/thematiques/limites/eau/comprendre/eau\\_univers/rappels-physiques/les-spectres-demission](http://accens-lyon.fr/accens/thematiques/limites/eau/comprendre/eau_univers/rappels-physiques/les-spectres-demission)

True, J. R., & Carroll, S. B. (2002). Gene co-option in physiological and morphological evolution. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18(1), 53–80. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.18.020402.140619>

Turner, J. R., White, E. M., Collins, M. A., Partridge, J. C., & Douglas, R. H. (2009). Vision in lanternfish (Myctophidae): Adaptations for viewing bioluminescence in the deep-sea. *Deep Sea Research I*, 56(6), 1003–1017. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2009.01.007>

Vanderlinden, C., & Mallefet, J. (2004). Synergic effects of tryptamine and octopamine on ophiuroid luminescence (Echinodermata). *Journal of Experimental Biology*, 207(21), 3749–3756. <https://doi.org/10.1242/jeb.01209>

Vassel, N., Cox, C. D., Naseem, R., Morse, V., Evans, R. T., Power, R. L., Brancale, A., Wann, K. T., & Campbell, A. K. (2012). Enzymatic activity of albumin shown by coelenterazine chemiluminescence. *Luminescence: The Journal of Biological and Chemical Luminescence*, 27(3), 234–241. <https://doi.org/10.1002/bio.2357>

Viviani, V. R. (2002). The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(11), 1833–1850. <https://doi.org/10.1007/PL00012509>

Widder, E. A. (2010). Bioluminescence in the ocean : Origins of biological, chemical, and ecological diversity. *Science*, 328(5979), 704–708. <https://doi.org/10.1126/science.1174269>

Widder, E. A., Latz, M. I., & Case, J. F. (1983). Marine bioluminescence spectra measured with an optical multichannel detection system. *The Biological Bulletin*, 165(3), 791–810. <https://doi.org/10.2307/1541479>

Wilson, T., & Hastings, J. W. (1998). Bioluminescence. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14, 197–230. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.197>

Woo, J., Howell, M. H., & Arnim, A. G. von. (2008). Structure–function studies on the active site of the coelenterazine-dependent luciferase from *Renilla*. *Protein Science*, 17(4), 725–735. <https://doi.org/10.1110/ps.073355508>

Woodley, J. D. (1975). The behaviour of some amphipod Brittle-Stars. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 18(1), 29–46. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(75\)90014-3](https://doi.org/10.1016/0022-0981(75)90014-3)

Woods Jr., W. A., Hendrickson, H., Mason, J., Lewis, S. M., Marshall, A. E. J., & Whitlock, E. M. C. (2007). Energy and predation costs of firefly courtship signals. *The American Naturalist*, 170(5), 702–708. <https://doi.org/10.1086/521964>

**Annexe 1 : Tableau récapitulatif de la recherche BLAST et BLAST réciproque sur l'ensemble des métazoaires et des bactéries.** \*Légende : Les cases grisées indiquent que le BLAST a donné une séquence annotée en tant que haloalkane déhalogénase, les cases non grisées indiquent une séquence annotée comme luciférase. E-value = espérance : une e-value faible indique une faible chance de trouver ce résultat par hasard.\*

#### A. Métazoaires

Embranchement	Espèce	BLAST		BLAST Réciproque	
		N° accession	E-value	N° accession	E-value
Annelida	<i>Capitella teleta</i>	ELT94308.1	2e-89	CAB3243013.1	2e-123
		ELU04432.1	7e-66	XP_028391043.1	7e-71
Chordata	<i>Branchiostoma belcheri</i>	XP_019625274.1	7e-104	XP_033098368.1	8e-144
		XP_019625275.1	1e-91	XP_041458146.1	1e-124
	<i>Phallusia mammillata</i>	CAB3243013.1	6e-103	XP_033098368.1	2e-132
	<i>Branchiostoma floridae</i>	XP_035680870.1	1e-99	XP_033098368.1	5e-142
		XP_035680871.1	8e-92	XP_792159.3	5e-122
	<i>Ciona intestinalis</i>	XP_002127127.1	2e-94	XP_041457548.1	2e-121
	<i>Styela clava</i>	XP_039247673.1	4e-83	XP_033098368.1	2e-111
		XP_039248495.1	2e-82	XP_792159.3	8e-112
		XP_039247674.1	7e-77	XP_002730984.1	4e-104

Cnidaria	<i>Renilla reniformis</i>	AAA29804.1	0.0	BAV38140.1	0.0
		P27652.1	0.0	/	/
	<i>Renilla muelleri</i>	AAG54094.1	0.0	BAV38140.1	0.0
		ABU41941.1	0.0	BAV38140.1	0.0
	<i>Dendronephtya gigantea</i>	XP_028394113.1	5e-125	XP_033098368.1	4e-134
		XP_028391043.1	3e-104	XP_002730984.1	4e-122
Echinodermata	<i>Lytechinus variegatus</i>	XP_041457548.1	1e-116	XP_028394113.1	2e-133
		XP_041458117.1	2e-115	XP_028394113.1	3e-130
		XP_041453323.1	1e-103	XP_002738321.1	1e-120
		XP_041453335.1	3e-102	XP_002730984.1	5e-118
		XP_041458131.1	6e-102	XP_002738321.1	3e-119
		XP_041457541.1	2e-101	XP_002730984.1	3e-117
		XP_041453259.1	5e-101	XP_002738321.1	5e-118
		XP_041458146.1	1e-40	XP_039248495.1	3e-54
	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	XP_792159.3	1e-114	XP_002738321.1	2e-131
		XP_030836985.1	1e-105	XP_019625274.1	5e-122
		XP_794218.3	2e-103	XP_002730984.1	7e-117
		XP_030836986.1	6e-103	XP_002730984.1	2e-116
		XP_030836989.1	2e-98	XP_002730984.1	7e-116
		XP_003729885.1	8e-67	XP_002730984.1	4e-82
		XP_030836987.1	7e-41	XP_039248495.1	2e-56
	<i>Anneissia japonica</i>	XP_033098368.1	4e-111	XP_019625274.1	2e-142

		XP_033118786.1	3e-78	XP_002738321.1	1e-101
	<i>Asterias rubens</i>	XP_033633173.1	2e-106	XP_002738321.1	1e-134
	<i>Apostichopus japonicus</i>	PIK55481.1	8e-104	XP_002738321.1	1e-125
		PIK55482.1	5e-98	XP_002738321.1	6e-121
		PIK32953.1	8e-55	XP_002738321.1	1e-72
		PIK32849.1	4e-49	XP_002738321.1	1e-58
	<i>Patiria miniata</i>	XP_038071042.1	2e-102	XP_002738321.1	1e-128
	<i>Acanthaster planci</i>	XP_022091703.1	6e-101	XP_002738321.1	4e-135
Hemichordata	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	XP_002730984.1	1e-103	XP_033098368.1	8e-129
		XP_002738321.1	2e-103	XP_033098368.1	7e-138
		XP_006811827.1	3e-53	XP_792159.3	3e-70
Placozoa	<i>Trichoplax sp. H2</i>	RDD37967.1	7e-78	CAB3243013.1	2e-108
	<i>Trichoplax adhaerens</i>	XP_002116677.1	9e-78	CAB3243013.1	4e-108
	<i>Trichoplax adhaerens</i>	XP_002116678.1	2e-75	HIM17664.1	9e-101

## B. Bactéries

Taxon	BLAST		BLAST réciproque	
	N° accession	E-value	N° accession	E-value
<i>Candidatus Hydrogenedentes bacterium</i>	HIA46746.1	2e-91	XP_019625274.1	1e-111
<i>Dehalococcoidia bacterium</i>	KPJ48875.1	4e-91	XP_019625274.1	4e-118
<i>Candidatus Rokubacteria bacterium</i>	MBI2162380.1	2e-91	XP_028394113.1	2e-117

## Annexe 2 : Solutions utilisées pour l'immunohistochimie

<b>Abréviations</b>	
Nom abrégé	Nom complet
BSA	Bovine Serum Albumine
PBS	Phosphate buffered saline
T	Tween 20
<b>Liste des solutions</b>	
Immunofluorescence sur coupe	
Solution de blocage : PBS-T-BSA	
Solution de rinçage PBS-T	
Milieu de montage : Vectashield H-1200 + DAPI	
Immunofluorescence en Whole Mount	
Solution de blocage T1	PBS+ 0,1% Triton X-100+ 3%BSA+ 0,05% NaN <sub>3</sub>
Solution de rinçage T2	PBS+ 0,1% Triton X-100 + 3% BSA
Solution de rinçage T3	PBS + 0,1% Triton X-100
Milieu de montage	Vectashield H-1200 + DAPI
<b>Liste des anticorps</b>	
Anti-RLuc A	Anticorps dirigé contre la luciférase A de <i>Renilla reniformis</i> fabriqué chez le lapin. Référence : GTX125851 Dilution : 1/250
Anti-RLuc C	Anticorps dirigé contre la luciférase C de <i>Renilla reniformis</i> fabriqué chez le lapin. Référence : GTX125853 Dilution : 1/100
Anti-Opsine 1.1	Anticorps dirigé contre l'opsine-c d' <i>Asterias rubens</i> fabriqué chez le lapin. Référence : ZBE20003 Dilution : 1/200
Anticorps secondaire	Alexafluor Anti-lapin 594

## Annexe 3 : Amplification d'ADN complémentaire

### A. Design d'amorces.

Les amorces utilisées ont été préalablement dessinées pour s'hybrider avec les séquences d'intérêt, à savoir les séquences génomiques de luciférase, et permettre leur amplification. Elles ont été modélisées sur le site en ligne Primer 3 (<https://primer3.ut.ee/>) selon des critères spécifiques (Tableau A3) et testées par PCR artificielle sur le programme AmplifX (v2.0.7) Sur les 10 gènes de luciférase, 6 paires d'amorces ont été sélectionnées (Tableau B3).

Tableau A1 : Critères utilisés pour le design d'amorces.

Critère	Valeur
Différence entre les températures de melting des deux amorces	< 5°C
Température de melting	55-65 °C
Taille de la séquence amplifiée	600-850 pb (sauf si la séquence ADN est de taille inférieure)
Taille des amorces	20-35 pb
Contenu en GC	40-60%

Tableau A2 : Liste des paires d'amorces designées pour chaque gène de luciférase.

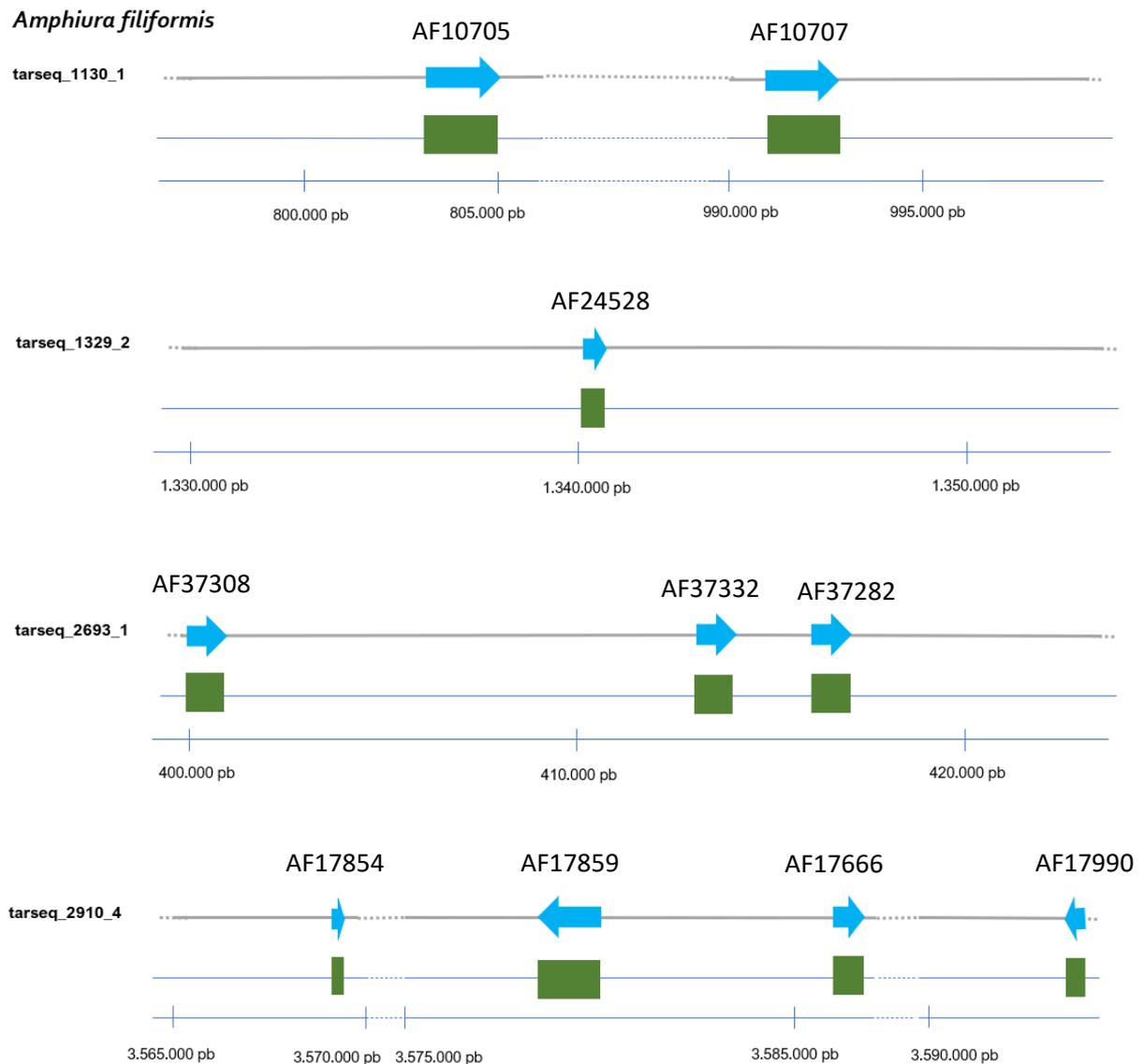
Gène d'intérêt	Nom des amorces	Séquence de l'amorce	Température d'hybridation
AF17859.1	AF17859.1 forward	5'-CTCTCATCGGTGTAGGGTGC-3'	55°C
	AF17859.1 reverse	5'-CTTCCTCACCGACGATTCCC-3'	
AF17990.1	AF17990.1 forward	5'-CAGGTTGGGATTTCTTTCTGACC-3'	54°C
	AF17990.1 reverse	5'-ATCTCTGCAAGCTTCTCCGG-3'	
AF10707.1	AF10707.1 forward	5'-CATTCTCATGTTGCGCCTG-3'	54°C
	AF10707.1 reverse	5'-TGCACTCACCTTCTGCTGG-3'	
AF37332.1	AF37332.1 forward	5'-GTCCATCCCACGTCAACCTC-3'	55°C
	AF37332.1 reverse	5'-TGCAAACGGTTCGCGATAAG-3'	
AF37308.1	AF37308.1 forward	5'-ACCCTCTCAAACACCTCGG-3'	55°C
	AF37308.1 reverse	5'-GAGCACCATCTTCTCCGG-3'	
AF24528.1	AF24528.1 forward	5'-TCCAGATCGTGTAGAAGCCATC-3'	55°C
	AF24528.1 reverse	5'-CACGAACAGCTTCTCCGATTTC-3'	

## B. Cycles d'incubation pour l'amplification d'ADN complémentaire.

Tableau B1 : Cycles d'incubation pour l'amplification d'ADN complémentaire

Etape	Température	Nombre de cycles	Action
1	98°C	1	Dénaturation de l'ADN
2	65°C -> 54-55 °C	11 cycles décroissant de 0,5°C par cycle + 24 cycles à 54-55°C	Hybridation des amorces sur l'ADNc
3	72°C	1	Elongation des séquences

## Annexe 4 : Structure des gènes homologues de Rluc/HD chez *A. filiformis*.



**Figure 3.4 :** Structure des gènes homologues de Rluc/HD chez *A. filiformis*. \*Légende : Chaque ligne grisée représente un contig. Les gènes et le sens des gènes sont représentés par les flèches bleues. Chaque barre verte représente un exon.\*