

Voir ou sentir, l'histoire d'*Astyanax mexicanus*

Maryline Blin, Sylvie Rétaux

► Les animaux utilisent des systèmes sensoriels pour percevoir les informations et les stimulations présentes dans leur environnement. Cette perception et son intégration par le cerveau permettent d'adopter en réponse un comportement précis et opportun. Cependant, on sait peu de choses sur la façon dont ces systèmes sensoriels évoluent chez les vertébrés, par exemple en réponse à des changements d'environnement ou de mode de vie.

Parmi les 200 espèces connues de poissons cavernicoles vivant dans l'obscurité totale et permanente de lacs et rivières souterrains, *Astyanax mexicanus* en est devenu l'« espèce modèle » : ces poissons n'ont ni yeux ni pigments, comme la majorité des espèces troglomorphiques. Il s'agit du seul cas pour lequel des populations de surface de la même espèce existent encore, ce qui permet d'explorer l'ensemble des aspects biologiques associés à cette situation par des approches comparées entre les deux morphotypes (Figure 1A). Diverses études décrivent des traits « constructifs » censés fournir des compensations sensorielles à la perte de vision dans l'obscurité et faciliter des comportements essentiels tels que la recherche de nourriture ou les interactions sociales [1]. L'*Astyanax* cavernicole s'avère ainsi un excellent modèle « évodévo » (évolution du développement), pour la recherche des modifications du développement embryonnaire qui sous-tendent la diversification des systèmes sensoriels à l'échelle micro-évolutive. Les divergences phénotypiques entre les deux morphes ont dû essentiellement apparaître en réponse à des différences d'environnement [2].

Le comportement de recherche alimentaire des *Astyanax* de surface (*surface fish* [SF]) est quasi-exclusivement guidé par la vision. En revanche, l'observation des *Astyanax* cavernicoles (*cavefish* [CF]) suggère qu'ils cherchent et détectent la nourriture grâce à des capacités chemo-sensorielles très développées [3]. Nous nous sommes donc intéressés à l'évolution de leur système olfactif.

Pour mesurer les capacités olfactives des larves, nous avons développé un test comportemental utilisant comme molécules odorantes des acides aminés, qui correspondent aux produits de dégradation de la nourriture dans l'eau et sont donc des informations olfactives appropriées pour les poissons (Figure 1B). Nous avons ainsi montré que les larves CF âgées d'un mois sont capables de détecter des concentrations 100 000 fois plus faibles que les larves SF (10^{-10} M en alanine pour les CF versus 10^{-5} M pour les SF, Figure 1C) [4]. Cette différence de capacités olfactives entre les deux morphes étant exceptionnelle, nous avons cherché à en comprendre l'origine en comparant les mécanismes de développement de leur organe sensoriel externe, l'épithélium olfactif.

Évolution développementale

L'épithélium olfactif (EO) des vertébrés, situé dans le nez, est tapissé de neurones sensoriels exprimant des récepteurs reconnaissant les molécules odorantes [5] (→). Après stimulation des récepteurs par des molécules dissoutes dans l'eau, ces neurones transmettent l'information

Institut des neurosciences Paris-Saclay, UMR9197, CNRS et université Paris-Sud, avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette, France.

sylvie.retaux@inaf.cnrs-gif.fr

sensorielle vers les bulbes olfactifs et le cerveau.

Au cours du développement, l'EO dérive d'un épaississement appelé placode (entourant le futur cerveau), qui se forme très précocement à la fin de la gastrulation (10 heures post-fertilisation chez *Astyanax*), et qui génère les organes sensoriels de la tête, dont l'EO et le cristallin de l'œil [6]. À ces stades embryonnaires, chez les CF, des modifications d'expression de molécules de signalisation dites « morphogènes » qui contrôlent la croissance et la formation des tissus contribuent à des changements dans la régionalisation de la placode par rapport aux embryons de SF : la placode olfactive présomptive du CF est plus grande que celle du SF au même stade, au détriment de la placode du cristallin qui est plus petite que celle du SF (Figure 2A). Il se produit donc une sorte d'échange (ou « trade-off » développemental) entre les territoires embryonnaires destinés à former les organes sensoriels visuels ou olfactifs, selon le morphotype d'*Astyanax* [4]. Pendant la suite du développement, entre 1 jour et 2 mois, l'EO est toujours significativement plus grand chez le CF que chez le SF [4, 7] (Figure 2B et C). L'ensemble de ces données indique que le CF possède un épithélium olfactif de plus grande taille, donc plus de neurones olfactifs que le SF, et que la spécialisation olfactive des *Astyanax* cavernicoles résulte en partie au moins d'un phénomène d'évolution développementale très précoce.

Plasticité développementale

La différence de taille de l'EO peut-elle, à elle seule, expliquer la diffé-



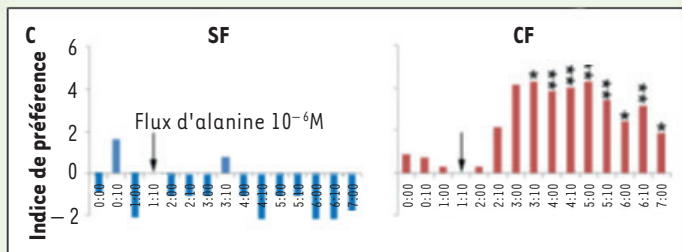
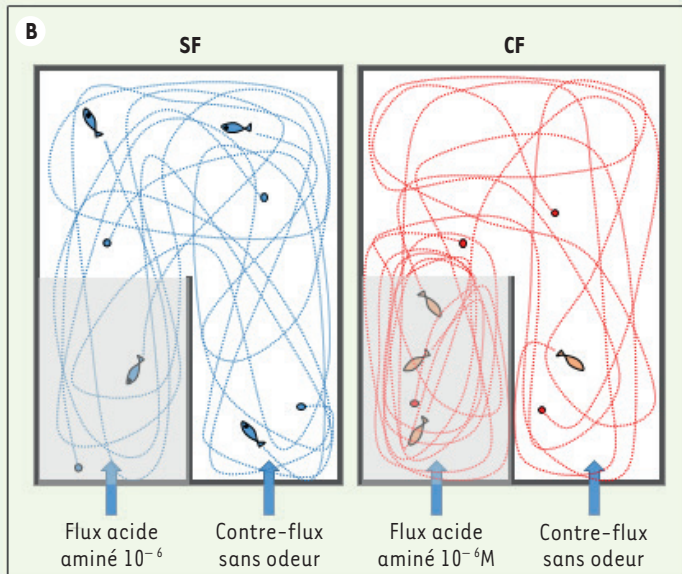
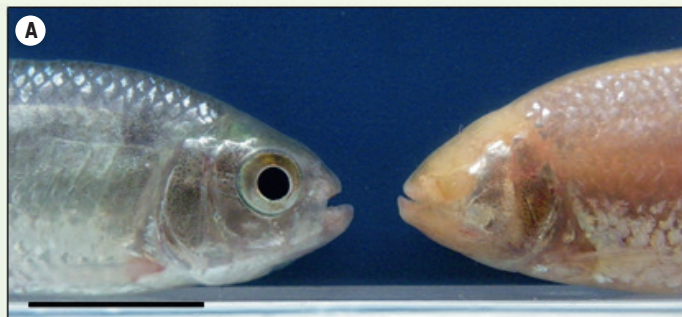


Figure 1. *Astyanax mexicanus*, morphologie et comportement olfactif. **A.** Les deux morphotypes de l'espèce *Astyanax mexicanus*. Vue de profil d'un adulte de surface (SF) à gauche et d'un adulte cavernicole (CF) aveugle et dépigmenté à droite. Barre d'échelle : 1,5 cm. **B.** Représentation schématique du test de comportement olfactif mis au point au laboratoire. Le test consiste à mettre 4 larves dans un aquarium en forme de U. De part et d'autre de la séparation centrale, un flux d'eau et un flux d'odorant arrivent en parallèle (flèches bleues). Les poissons nagent librement (les lignes en pointillés bleus pour les SF et rouges pour les CF représentent leur parcours). Afin de comparer les capacités olfactives des SF et des CF aveugles, le test est effectué dans le noir et filmé en caméra infrarouge. Il dure 7 minutes. Nous comptons toutes les 30 secondes le nombre de poissons dans la zone odorante (en grisée sur le dessin) et calculons un indice de préférence. **C.** Résultats de comportement olfactif. Graphes représentant l'indice de préférence (en ordonnée) en fonction du temps (en abscisse). Si cet indice est nul, les poissons n'ont pas de préférence et l'on considère que l'odeur n'est pas détectée ; s'il est négatif, l'odeur est détectée et considérée comme répulsive ; s'il est positif l'odeur est détectée et attractive. Sur le graphe bleu, les SF ont un indice de préférence autour de zéro pendant toute la durée du test, nous en concluons qu'ils n'ont pas d'odorat. Sur le graphe rouge, les CF ont un indice de préférence positif pendant plus de quatre minutes consécutives (ils sont localisés dans la zone odorante), nous en concluons qu'ils sentent l'odeur à la concentration donnée. Pour les deux graphes, la flèche noire verticale indique l'ouverture du flux d'alanine à 10^{-6} M. Les astérisques indiquent que la mesure est statistiquement significative (test de Wilcoxon-Mann-Whitney¹ [Le test de Wilcoxon-Mann-Whitney ou test de la somme des rangs de Wilcoxon est un test statistique

non paramétrique qui permet de tester l'hypothèse selon laquelle la distribution des données est la même dans deux groupes.]). Figure traduite et adaptée de [4].

rence majeure de capacités olfactives entre les deux morphes d'*Astyanax* ? Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des expériences de comportement.

Les alevins SF âgés de 2 mois, qui possèdent un EO proportionnellement plus grand que ceux d'un mois, ont le même seuil de détection pour l'alanine. Les hybrides d'1 mois issus de croisements entre un poisson SF et un poisson CF,

bien que possédant de plus grands EO que les CF, ont des capacités olfactives encore moins bonnes que celles des SF (Figure 2D). Il semble donc que 1) la taille de l'EO n'est pas strictement corrélée aux capacités olfactives, 2) les compétences olfactives correspondent à un trait génétique récessif ou complexe. Nous avons donc envisagé un autre mécanisme possible : la plasticité développementale dépendante de l'environnement.

Nous avons élevé des SF dans l'obscurité complète permanente (SF-Dark), et nous avons comparé leurs capacités olfactives à celles de SF élevés normalement, à la lumière (SF-Lux). Les larves SF-Dark ont une plus grande capacité olfactive que les SF-Lux, et ceci bien que leurs EO soient de même taille (Figure 2D). Ce résultat confirme que la taille de l'EO n'est pas strictement prédictive de la performance olfac-

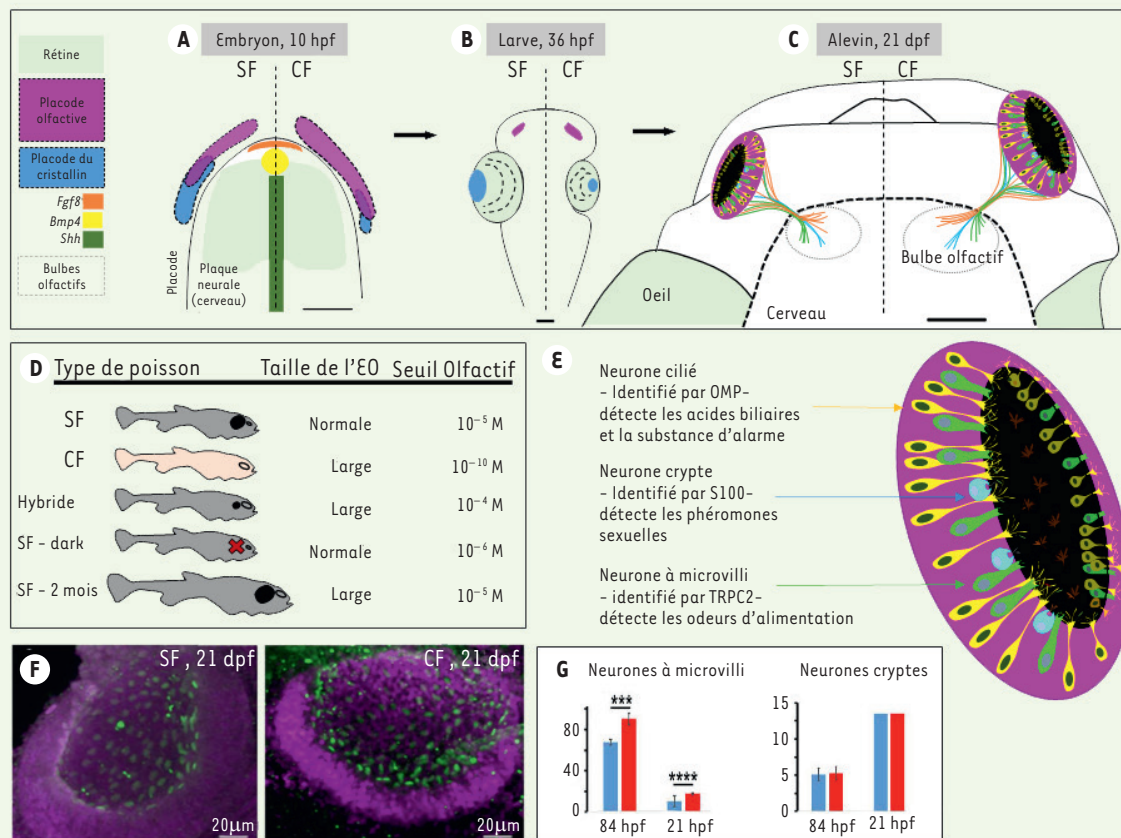


Figure 2. Développement et composition neuronale de l'épithélium olfactif. A-B-C. Développement comparatif des poissons cavernicoles (CF) et de surface (SF). Dans les trois schémas, la moitié de gauche représente un individu SF, celle de droite un individu CF. Le code couleur permet le suivi des tissus et organes au cours du développement. **A.** Schéma d'une vue dorsale de la future tête d'un embryon de 10 heures post-fécondation (hpf). Des modifications d'expression des facteurs morphogènes Shh (*Sonic hedgehog*, vert), Fgf8 (*Fibroblast growth factor 8*, orange), Bmp4 (*Bone morphogenetic protein 4*, jaune) contribuent à modifier la régionalisation de la placode. Chez le CF (moitié droite), la placode olfactive (en magenta) est plus grande, aux dépens de celle du cristallin (en bleu) qui est plus petite. **B.** Schéma d'une vue dorsale de la tête d'une larve de 36 hpf. L'épithélium olfactif (EO) en développement (magenta) est plus grand chez le CF alors que l'œil en début de dégénérescence (rétine et cristallin) est plus petit. **C.** Schéma d'une vue dorsale de la tête d'un alevin de 21 jours post-fécondation (dpf). L'EO est connecté au bulbe olfactif par le nerf olfactif composé des prolongements axonaux des neurones olfactifs. L'EO du CF (ainsi que ses bulbes olfactifs) est plus grand que l'EO de SF. Barres d'échelle = 100 μ m. **D.** Relation entre la morphologie et le comportement. La taille de l'EO et de l'œil des SF âgés d'un mois est considérée comme « normale » et sert de référence pour les comparaisons. Les hybrides sont la progéniture d'un croisement SF et CF, ils possèdent un œil plus petit et un OE plus grand que ceux des SF, mais un odorat moins développé (seuil de détection de l'alanine : 10^{-4} M). Les SF-dark sont élevés dans le noir depuis le stade une cellule, leur œil et EO sont inchangés en taille, mais ils ont un meilleur odorat que les SF témoins. Les SF-2 mois sont plus grands car plus vieux et ont un grand EO (chez les poissons, la croissance est continue avec l'âge), mais leur odorat n'est pas meilleur qu'à un mois. **E.** Agrandissement en fausse perspective de la vue dorsale de l'EO de CF de 21 jours post-fécondation (dpf). À ce stade de développement, l'EO a une forme de coupelle, il est principalement constitué de neurones dont les cils et microvillosités tapissent la surface intérieure, en contact avec le milieu extérieur. Les 3 types de neurones olfactifs sont représentés. Les marqueurs utilisés pour les identifier sont OMP (*olfactory marker protein*), S100 (une famille de protéines qui possède un domaine de liaison au calcium) et TRPC2 (*transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 2*). **F.** Marquage des neurones à microvillosités. Photos d'EO d'alevins SF et CF de 21 jours prises au microscope confocal. Le marquage violet est une contre-coloration nucléaire. Le marquage vert identifie les neurones à microvillosités par immunofluorescence dirigée contre la protéine TRPC2. **G.** Quantification. Les graphes montrent la quantification de la densité de neurones (en ordonnée, nombre de neurones par $10^5 \mu\text{m}^3$ d'EO) en fonction des stades et des morphotypes, avec code couleur : bleu, SF ; rouge, CF. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative (test de Wilcoxon-Mann-Whitney). Figure traduite et adaptée de [6].

tive. Il montre aussi que des processus développementaux qui dépendent de la fonction visuelle sont susceptibles de moduler les compétences olfactives chez *Astyanax mexicanus*. Il existe donc une plasticité phénotypique fonctionnelle entre les modalités sensorielles olfactive et visuelle, qui peut contribuer à l'excellent odorat des *Astyanax cavernicoles*.

Neurogenèse et types neuronaux

L'ÉO des poissons contient trois grands types de neurones sensoriels olfactifs (NSO), qui se distinguent par leur morphologie, leur localisation dans l'ÉO, et les familles de récepteurs olfactifs qu'ils expriment : les neurones ciliés, à microvillosités, et de crypte (Figure 2E). Toute modification dans la quantité ou la qualité de ces neurones est donc susceptible d'engendrer des variations de capacités sensorielles. Nous nous sommes donc intéressés au contrôle de la neurogenèse dans l'ÉO des deux morphes d'*Astyanax*.

La taille de l'ÉO des CF étant supérieure à celle de l'ÉO des SF, toutes les données ont été normalisées et exprimées en densité par unité de volume. Nous avons découvert que chez les deux morphes (1) la densité des progéniteurs neuronaux dans l'ÉO est identique, (2) leurs propriétés prolifératives en termes de durée du cycle cellulaire et de taux de réinitialisation d'un cycle cellulaire après génération d'un neurone sont les mêmes, (3) la chronologie d'apparition des trois types de NSO pendant le développement larvaire est la même, et (4) la durée de vie des neurones olfactifs qui se renouvellent tout au long de la vie comme chez tous les vertébrés est identique et d'environ cinq semaines. En somme, les grands événements cellulaires qui ont lieu au cours de la vie des neurones olfactifs sont identiques dans les ÉO de SF et CF.

En revanche, les proportions des trois types de NSO diffèrent entre les deux morphes. À trois jours, la densité de neurones ciliés est plus élevée chez le

SF. Nous n'avons pu quantifier les neurones ciliés à trois semaines car ils sont en quantité trop importante (représentant 90 % des neurones de l'ÉO) pour être comptabilisés à ce stade, ce qui nous empêche de conclure sur la persistance de la différence au cours du développement. Par contre, la densité de neurones à microvillosités est plus élevée chez CF à 3 jours et à 3 semaines (Figure 2F et G). Enfin, les densités des neurones de crypte sont identiques aux deux stades étudiés (Figure 2G). Ces résultats de neuroanatomie développementale montrent qu'il existe une différence SF/CF dans les proportions de NSO à microvillosités, et il est possible que l'augmentation de ce type neuronal chez le CF se fasse au détriment des neurones ciliés. Or, chez d'autres espèces de poissons comme le poisson zèbre, la truite ou le poisson rouge, les neurones à microvillosités sont activés par les odeurs alimentaires telles que les acides aminés [8]. Une telle différence dans la composition neuronale des ÉO des deux morphes d'*Astyanax* est donc également susceptible d'expliquer en partie leur différence de réponses comportementales aux acides aminés.

Conclusions

L'ensemble de ce travail nous permet de proposer différents mécanismes ou composantes impliqués dans l'évolution du système olfactif des *Astyanax cavernicoles* - et par là même d'envisager de façon plus générale les mécanismes d'évolution des systèmes sensoriels chez les animaux.

1. Par une évolution développementale du contrôle de la taille de l'organe olfactif est due à des phénomènes embryonnaires précoces qui régulent de façon concertée l'importance des dérivés sensoriels visuels et olfactifs au niveau de la placode. Un tel compromis développemental (ou *trade-off*) suggère que les yeux des poissons cavernicoles pourraient avoir été perdus suite à un phénomène de sélection indirecte :

c'est l'augmentation de la spécialisation olfactive qui serait avantageuse et sélectionnée, et entraînerait, indirectement, la diminution de taille et la perte des yeux.

La plasticité phénotypique a pu être recrutée lorsque les ancêtres de surface des populations actuelles ont initialement colonisé les grottes il y a 20 000 ans [9]. Cette composante de plasticité développementale a sans doute été cruciale pour leur survie en conditions extrêmes, et les allèles la favorisant ont peut-être été sélectionnés et génétiquement assimilés dans la population cavernicole.

2. Par une évolution de la composition neuronale des ÉO. L'origine, probablement développementale, de la plus grande densité en neurones à microvillosités chez les CF, reste à déterminer.

L'évolution prend-elle toujours le même chemin ? Il existe au Mexique différentes populations cavernicoles d'*Astyanax mexicanus* vivant dans des grottes dont l'environnement et les conditions écologiques sont variables. Nous testons actuellement *in situ*, dans différentes grottes, les capacités olfactives de populations d'*Astyanax cavernicoles* sauvages¹ [3]. Les résultats seront à analyser aux regards des données de génomique comparée et de génétique des populations (mutations différentes apparues et/ou fixées dans différentes grottes ?) et de ce que nous connaissons sur l'environnement spécifique dans ces différentes grottes (apport en énergie, conditions de croissance), afin d'obtenir une vision intégrée de l'évolution et de l'adaptation des systèmes sensoriels des *Astyanax cavernicoles* [10]. ♦

To see or to smell, the story of *Astyanax mexicanus*

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

¹ Mifsud N, Baker N. Poissons mexicains : une fenêtre sur l'évolution. *CNRS Image* 2017. <https://lejournel.cnrs.fr/videos/poissons-mexicains-une-fenetre-sur-levolution>.



RÉFÉRENCES

1. Borowsky R. Cavefishes. *Curr Biol* 2018 ; 28 : R60-4.
2. Rétaux S, Casane D. Evolution of eye development in the darkness of caves: adaptation, drift, or both? *Evo Devo* 2013; 4 : 26.
3. Bibliowicz J, Alié A, Espinasa L, et al. Differences in chemosensory response between eyed and eyeless *Astyanax mexicanus* of the Rio Subterraneo cave. *Evo Devo* 2013 ; 4 : 25.
4. Hinaux H, Devos L, Bibliowicz J, et al. Sensory evolution in blind cavefish is driven by early events during gastrulation and neurulation. *Development* 2016 ; 143 : 4521-32.
5. Lepoupez G, Gheusi G. Olfaction : quand le cerveau redistribue les cartes. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 687-9.
6. Torres-Paz J, Whitlock KE. Olfactory sensory system develops from coordinated movements within the neural plate. *Dev Dyn* 2014 ; 243 : 1619-31.
7. Blin M, Tine E, Meister L, et al. Developmental evolution and developmental plasticity of the olfactory epithelium and olfactory skills in Mexican cavefish. *Dev Biol* 2018 ; 441 : 242-51.
8. Sato K, Suzuki N. Whole-cell response characteristics of ciliated and microvillous olfactory receptor neurons to amino acids, pheromone candidates and urine in rainbow trout. *Chem Senses* 2001 ; 26 : 1145-56.
9. Fumey J, Hinaux H, Noirod C, et al. Evidence for late pleistocene origin of *Astyanax mexicanus* cavefish. *BMC Evol Biol* 2018 ; 18 : 43.
10. Torres-Paz J, Hyacinthe C, Pierre C, Rétaux S. Towards an integrated approach to understand Mexican cavefish evolution. *Biol Lett* 2018 ; 14 : pii: 20180101.

NOUVELLE

MOSPD2, un connecteur inter-organites

Thomas Di Mattia¹⁻⁴, Catherine Tomasetto¹⁻⁴, Fabien Alpy¹⁻⁴

¹Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC), 1, rue Laurent Fries, 67400 Illkirch, France.

²Inserm U1258, 67400 Illkirch, France.

³CNRS UMR7104, 67400 Illkirch, France.

⁴Université de Strasbourg, 67400 Illkirch, France.

thomas.di-mattia@igbmc.fr

catherine-laure.tomasetto@igbmc.fr

► Les cellules eucaryotes sont compartimentées en organites distincts associés à des fonctions spécialisées. La littérature récente montre que ces organites ne flottent pas indépendamment dans le cytoplasme, mais forment un réseau interdépendant au sein duquel ils collaborent. La formation de sites de contact membranaire (SCM) confère un support physique à l'échange de matériel, au positionnement et à la fission d'organites, et à la communication entre organites. Ces zones de contact sont caractérisées par un rapprochement étroit (< 30 nm) des membranes de deux organites distincts [1]. Dans ce réseau, le réticulum endoplasmique (RE), composé de tubes et de feuillettes, se distingue par sa morphologie ramifiée couvrant l'intégralité du cytoplasme et par sa capacité à établir des contacts avec la plupart des autres organites. De ce fait, le RE joue un rôle central dans la coopération entre les organites [2].

Au niveau moléculaire, la formation des SCM nécessite des interactions protéiques et/ou protéo-membranaires à l'interface des organites impliqués [3]. L'identification des complexes contribuant à la formation des SCM est essen-

tielle pour comprendre la fonction de ces micro-domaines. Deux acteurs majeurs de la formation des ponts moléculaires entre le RE et les autres organites sont connus [4] ; ces protéines, nommées VAP-A et VAP-B (*VAMP-associated protein*) chez l'homme, résident sur le RE et contiennent un domaine MSP (*major sperm protein*) faisant face au cytoplasme. Ce domaine agit comme un harpon moléculaire, en interagissant avec de petits motifs linéaires appelés FFAT (*two phenylalanines in an acidic tract*) présents chez une grande variété de protéines soit cytoplasmiques, soit présentes à la surface d'un organite tel que l'appareil de Golgi, les mitochondries, les endosomes, les peroxysomes et la membrane plasmique [4]. Diverses fonctions biologiques ont récemment été associées aux SCM bâtis par les VAP, comme l'homéostasie calcique, le transport des lipides, le positionnement des endosomes et l'autophagie [5-7]

Étonnamment, il a été montré que la perte d'expression conjointe de VAP-A et VAP-B ne provoque qu'une perte partielle des contacts entre le RE et les autres organites cellulaires [8, 9]. Ces données suggéraient fortement que l'ab-

sence des protéines VAP dans la cellule pouvait être compensée, probablement par une autre protéine cellulaire ayant également la capacité d'interagir avec les motifs FFAT. Comme aucun mécanisme capable de supplanter l'action des VAP n'avait été décrit, nous avons exploré cette possibilité. Pour trouver l'ensemble des protéines capables d'interagir avec les motifs FFAT, nous avons réalisé une expérience de purification en utilisant comme appât un peptide portant un motif FFAT consensus, celui de la protéine ORP1L (*oxysterol-binding protein-related protein 1*). L'identité de l'ensemble des protéines retenues spécifiquement par cet appât a ensuite été révélée par spectrométrie de masse. Par cette approche protéomique non biaisée, nous avons identifié avec un grand score de confiance une nouvelle protéine nommée MOSPD2 (*motile sperm protein domain-containing 2*) [10].

Au niveau structural, MOSPD2, à l'instar des protéines VAP, possède un domaine MSP central. Une analyse *in silico* a permis de montrer que, malgré une faible homologie de séquences primaires, les domaines MSP de MOSPD2 et des VAP possèdent une structure tridimension-