

La coelentérazine, substrat de la réaction lumineuse, depuis son  
acquisition trophique jusqu'à sa localisation histologique chez  
l'ophiure *Amphiura filiformis*

Parise Laura

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme  
de Master en Biologie des Organismes et Écologie

Promoteur : Jérôme Malfet, UCLouvain

Encadrants : Constance Couvris, UCLouvain

Laurent Du châtelet, UCLouvain

Année académique 2023-2024

# Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur Malfet, mon promoteur, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce mémoire au sein de son unité de recherche.

Je souhaite également remercier l'ensemble de l'équipe de recherche pour leur accueil chaleureux et leur générosité dans le partage de leurs connaissances. Un remerciement tout particulier à Constance pour son encadrement pendant les longues journées de manipulation et pour son aide précieuse dans la gestion des frustrations lorsque certaines analyses ne se déroulaient pas comme prévu. Son soutien a été inestimable.

Je remercie Marie-Christine pour sa patience et ses conseils lors de l'apprentissage des techniques de microscopie. Sa guidance a été essentielle pour maîtriser ces outils complexes.

Je suis également reconnaissant envers les membres de mon jury pour avoir accepté de lire et d'évaluer mon mémoire.

Un grand merci à mes proches pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de mon parcours académique, et pour leur compréhension et leur soutien dans ma décision de poursuivre mes études avec un master.

Enfin, je souhaite dédier une pensée particulière à ma mamy, qui nous a quittés trop tôt. Merci d'avoir toujours été là pour moi, en toutes circonstances. Et même si tu ne verras pas la fin de mon aventure, je sais que de là-haut, tu gardes un œil sur moi.

# Résumé

La bioluminescence est un phénomène par lequel des organismes vivants produisent de la lumière via une réaction chimique impliquant un substrat appelé luciférine et une enzyme, la luciférase. Ce processus, largement répandu dans le milieu marin, joue un rôle crucial dans la défense, la prédation et la communication entre les espèces. Parmi les quatre types de luciférines présentes dans le milieu marin, la coelentérazine est la plus répandue, utilisée par une grande variété d'organismes, y compris les ophiures comme *Amphiura filiformis*.

Cette large distribution de la coelentérazine dans le milieu marin soutient l'hypothèse de son acquisition trophique. Cette acquisition trophique permettant alors à des organismes de réaliser des réactions de bioluminescence sans synthétiser par eux-mêmes le substrat de la réaction. L'acquisition trophique de la coelentérazine a été démontrée chez plusieurs organismes bioluminescents, y compris *A. filiformis*.

Le premier objectif de cette étude est de caractériser la récupération des capacités lumineuses de *A. filiformis* après un apport unique de coelentérazine exogène, suite à une période de 22 mois en captivité où les animaux avaient été privés de cette molécule, entraînant une incapacité à produire de la lumière. Nos analyses ont mis en évidence une augmentation significative de la concentration en coelentérazine dans les tissus ainsi qu'une récupération significative des capacités effectives à produire de la lumière.

Le deuxième objectif de cette étude est visualisé histologiquement la coelentérazine et la luciférase chez notre sujet. La visualisation de la coelentérazine par autofluorescence, ainsi que l'immunomarquage de la luciférase, ont montré leur localisation commune à la base des piquants et à l'extrémité distale des bras. Ces résultats confirment la colocalisation de l'enzyme et de son substrat.

Les résultats de cette étude renforcent l'hypothèse de l'acquisition trophique de la coelentérazine et démontrent la robustesse du système bioluminescent de *A. filiformis*. Ces travaux ouvrent la voie à des recherches futures sur les mécanismes moléculaires de l'absorption et de la distribution de la coelentérazine, affrontant une meilleure compréhension de la bioluminescence chez cette espèce.

# Abstract

Bioluminescence is a phenomenon where living organisms produce light through a chemical reaction involving a substrate called luciferin and an enzyme called luciferase. This process, widely found in the marine environment, plays a crucial role in defense, predation, and communication among species. Among the four types of luciferins present in the marine environment, coelenterazine is the most widespread, utilized by a wide variety of organisms, including ophiuroids like *Amphiura filiformis*.

This widespread distribution of coelenterazine in the marine environment supports the hypothesis of its trophic acquisition, which allows organisms to perform bioluminescent reactions without synthesizing the reaction substrate themselves. The trophic acquisition of coelenterazine has been demonstrated in several bioluminescent organisms, including *A. filiformis*.

The primary objective of this study is to characterize the recovery of bioluminescent capabilities in *A. filiformis* following a single administration of exogenous coelenterazine, after a 22-month period in captivity during which the animals were deprived of this molecule, leading to an inability to produce light. Our analyses revealed a significant increase in coelenterazine concentration in the tissues, as well as a significant recovery of effective light production capabilities.

The second objective of this study is to histologically visualize coelenterazine and luciferase in our subject. The visualization of coelenterazine through autofluorescence, as well as the immunolabeling of luciferase, showed their common localization at the base of the spines and the distal ends of the arms. These results confirm the colocalization of the enzyme and its substrate.

The findings of this study strengthen the hypothesis of the trophic acquisition of coelenterazine and demonstrate the robustness of the bioluminescent system in *A. filiformis*. This work paves the way for future research on the molecular mechanisms of coelenterazine absorption and distribution, leading to a better understanding of bioluminescence in this species.

# Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>1</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>2</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>4</b>
<b>Lexique</b> .....	<b>8</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>10</b>
<b>1 Bioluminescence</b> .....	<b>10</b>
1.1 Définition.....	10
1.2 Bioluminescence dans le monde vivant.....	10
1.3 Fonctions de la bioluminescence dans le milieu marin.....	14
1.3.1 Défense.....	14
1.3.2 Prédation.....	15
1.3.3 Communication.....	16
1.4 Biochimie de la bioluminescence.....	16
1.4.1 Réaction chimique.....	16
1.4.2 Système de bioluminescence : luciférine/luciférase et photoprotéine.....	17
1.4.3 Distribution.....	19
1.5 Bioluminescence intrinsèque et extrinsèque.....	20
<b>2 Échinodermes</b> .....	<b>21</b>
2.1 Généralités.....	21
2.2 Ophiures.....	21
2.2.1 Classification et description morphologique.....	21
2.2.2 Habitat.....	22
2.2.3 Alimentation.....	22
2.2.4 Bioluminescence.....	22
<b>3 <i>Amphiura filiformis</i></b> .....	<b>23</b>

3.1	Généralités.....	23
3.2	Bioluminescence.....	25
3.2.1	Acquisition trophique .....	26
	<b>Objectifs du mémoire .....</b>	<b>28</b>
	<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>29</b>
1	Collecte et maintien en captivité.....	29
2	Induction .....	29

<b>3</b>	<b>Échantillonnage et dissection.....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>Évaluation des capacités lumineuses.....</b>	<b>32</b>
4.1	Calibration du luminomètre .....	32
4.2	Émission totale de lumière : dépolarisation au KCl.....	33
4.3	Concentration en coelentérazine .....	34
4.4	Activité luciférasique .....	36
4.5	Analyses statistiques.....	37
<b>5</b>	<b>Visualisation histologique.....</b>	<b>38</b>
5.1	Visualisation de la coelentérazine par autofluorescence.....	38
5.2	Visualisation de la luciférase par immunofluorescence.....	38
5.2.1	Préparation de l'échantillon .....	39
5.2.2	Visualisation.....	41
	<b>Résultats.....</b>	<b>42</b>
<b>1</b>	<b>Émission totale de lumière : dépolarisation au KCl .....</b>	<b>42</b>
<b>2</b>	<b>Concentration en coelentérazine .....</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>Activité luciférasique.....</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>Autofluorescence de la coelentérazine.....</b>	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>Immunomarquage de la luciférase .....</b>	<b>46</b>
	<b>Discussion.....</b>	<b>47</b>
<b>1</b>	<b>Récupération rapide de coelentérazine dans les tissus.....</b>	<b>47</b>
<b>2</b>	<b>Confirmation de l'hypothèse d'acquisition trophique .....</b>	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>Différence entre disponibilité du substrat et récupération fonctionnelle des capacités lumineuses.....</b>	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>Colocalisation de la coelentérazine et de la luciférase.....</b>	<b>48</b>
<b>5</b>	<b>Expression stable de luciférase endogène .....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>Analyse critique et perspective d'amélioration.....</b>	<b>49</b>

6.1	Analyses luminométriques .....	49
6.2	Immunodétection .....	50
<b>7</b>	<b>Perspectives futures .....</b>	<b>51</b>
	<b>Conclusion .....</b>	<b>52</b>
	<b>Bibliographie .....</b>	<b>54</b>
	<b>Annexes.....</b>	<b>60</b>

# Lexique

<b>Aboral</b>	Désigne la face de l'organisme qui est opposée à la bouche (en opposition avec la face orale)
<b>Aphotique</b>	Zone dans les océans à partir de laquelle les rayonnements solaires ne pénètrent plus la colonne d'eau soit à partir de 1000 mètres de profondeur
<b>Autotomie</b>	Auto-amputation d'une partie de son corps pour faciliter sa fuite
<b>Bathypélagique</b>	Zone océanique se trouvant entre 1000 et 4000 mètres de profondeur
<b>Benthique</b>	Relatif au fond de l'eau
<b>Bioluminescence</b>	Émission de lumière visible par un organisme vivant via une réaction chimique
<b>Bioluminescence extrinsèque</b>	Émission de lumière impliquant la symbiose bactérienne
<b>Bioluminescence intrinsèque</b>	Émission de lumière n'impliquant pas de symbiose
<b>Coelentérazine</b>	Luciférine la plus représentée dans le milieu marin
<b>Convergence évolutive</b>	Mécanisme évolutif menant à la possession de traits semblables par des organismes, qui ne soient pas hérités d'un ancêtre commun
<b>Dysphotique</b>	Zone dans les océans (entre 200 et 1000 mètres de profondeur) à partir de laquelle l'intensité de lumineuse qui pénètre la colonne d'eau est inversement proportionnelle à la profondeur. Plus la profondeur augmente, plus l'intensité lumineuse diminue.
<b>Euphotique</b>	Zone de la colonne d'eau (entre 0 et 200 mètres de profondeur) dans laquelle la lumière solaire est capable de pénétrer, rendant l'activité photosynthétique possible
<b>Fluorescence</b>	Capacité pour un molécule dite « excitée » d'émettre un photon de manière immédiate
<b>Intertidale</b>	Zone côtière comprise entre la marée haute et la marée basse

<b>Luciférase</b>	Terme générique désignant une enzyme qui catalyse l'oxydation d'un substrat, une luciférine, permettant l'émission de lumière
<b>Luciférine</b>	Terme générique désignant une molécule oxydée permettant une émission de lumière
<b>Mésopélagique</b>	Zone océanique se trouvant entre 200 et 1000 mètres de profondeur
<b>Pélagique</b>	Relatif à la colonne d'eau
<b>Phosphorescence</b>	Capacité pour une molécule à accumuler de l'énergie suite à une excitation lumineuse, et de libérer cette énergie sous forme d'un photon après un certain délai
<b>Photocyte</b>	Cellule où se produit la réaction lumineuse
<b>Photophore</b>	Organe lumineux composé de photocytes
<b>Piquant</b>	Prolongement squelettique présent sur les bras des ophiures, zone émettrice de lumière chez <i>Amphiura filiformis</i>
<b>Podia</b>	Organes présents le long du corps des échinodermes, jouant un rôle dans la locomotion, dans l'alimentation et la respiration
<b>Scute</b>	Terme désignant la plaque calcaire qui compose le squelette des échinodermes
<b>Sympatrique (espèce)</b>	Deux espèces génétiquement proches sont dites sympatriques lorsqu'on les retrouve dans la même zone géographique sans hybridation entre elles deux

# Introduction

## 1 Bioluminescence

### 1.1 Définition

La bioluminescence est définie comme l'émission de lumière visible par un organisme vivant (Harvey, 1952). La bioluminescence se différencie de la fluorescence et de la phosphorescence, car contrairement à celles-ci, il s'agit d'une réaction chimique. Dans le cas de la fluorescence, une molécule ou un pigment absorbe un photon, ce qui excite l'électron et l'élève à un niveau énergétique supérieur. Afin de revenir à son état fondamental, l'électron libère presque immédiatement l'énergie accumulée sous forme de lumière. La phosphorescence quant à elle, fonctionne sur le même principe avec pour différence un délai entre la période d'excitation et la phase de relâchement des photons (Haddock et al., 2010).

### 1.2 Bioluminescence dans le monde vivant

Sur l'ensemble du vivant, la bioluminescence est une capacité rare en termes de nombre d'espèces. En effet, parmi les genres connus, seulement 0,2 % d'entre eux possèdent des espèces bioluminescentes (Mallefet, 2009). On va retrouver ce phénomène dans à peu près 800 genres et plus en détail chez 10 000 espèces (Haddock et al., 2010 ; Fleiss et Sarkisyan, 2019).

Phylogénétiquement, la bioluminescence est un phénomène diversifié retrouvé dans plus de 13 embranchements (Hasting, 2012 ; Kaskova et al., 2016). La bioluminescence se retrouve chez des organismes très distincts comme les bactéries, les champignons, les algues unicellulaires, les cnidaires, les cténophores, les németes, les mollusques, les annélides, les arthropodes, les bryozoaires, les échinodermes, les hémichordés, les urochordés et les vertébrés (Herring, 1987 ; Mallefet, 2009 ; Hasting, 2012 ) (Figure 1). Récemment, le plus grand vertébré dont la bioluminescence est démontrée a été identifié. Il s'agit d'une espèce de requin vivant en eau profonde, le *Dalatias licha* (Mallefet et al., 2021). Il y a certains taxons pour lesquels aucun organisme bioluminescent n'est, à ce jour, recensé. Le recensement actuel des espèces lumineuses est dépendant de l'effort d'échantillonnage et de la facilité d'investigation des milieux, comme par exemple la zone abyssale qui est difficile d'accès. Le recensement des espèces bioluminescentes est de ce fait certainement sous-estimé (Mallefet, 2009 ; Haddock et al., 2010 ; Fleiss et Sarkisyan, 2019). Pour reprendre les mots d'Harvey concernant la distribution phylogénétique de la bioluminescence, « C'est comme si les différents groupes

avaient été inscrits sur un tableau noir et qu'une poignée de sable humide avait été jetée sur les noms. À l'endroit où chaque grain de sable se pose, une espèce lumineuse apparaît. Il est extraordinaire qu'une espèce d'un genre puisse être lumineuse et qu'une autre espèce étroitement apparentée ne sont pas capable d'émettre de la luminescence » (Harvey, 1952).



Figure 1: Photographies de différents organismes bioluminescents, mettant en évidence la diversité d'organismes. a) boîte de pétri contenant des bactéries bioluminescentes, b) radiolaires *Polycystinea* coloniaux c) hydrozoaire *Aequorea victoria*, d) siphonophore *Erenna* sp, e) polychète *Tomopteris*, f) larve planctonique de l'hémichordé *Ptychodera flava*, g) champignons *Gerronema viridilucens*, h) céphalopode *Vampyroteuthis infernalis*, i) chaetognathe *Caecosagitta macrocephala*, j) cténophore *Beroe forskalii*, k) céphalopode *Abraliopsis* sp, l) cnidaire *Beroe forskalii*, m) crustacé *Thysanoessa* sp, n) *Chaenophryne longiceps*, o) ostracode *Conchoecia* sp, p) poisson de la famille des Sternoptychidae, q) copépode *Gaussia princeps*, r) poisson de la famille des Myctophidae, s) *Tactostoma* sp et t) luciole *Photinus pyralis* (Modifiée de Haddock et al., 2010, Desjardin et al., 2008, Xerces Society, s.d.).

Il est également important de notifier que la bioluminescence est un phénomène retrouvé en majorité dans le milieu marin. En effet, parmi les genres contenant des espèces bioluminescentes, 80 % sont issus de l'écosystème marin (Widder, 2010). Comme pour la phylogénie de la bioluminescence, cette disparité entre les milieux marins, terrestres et dulçaquicoles n'est pas encore comprise, mais certaines propriétés de l'écosystème marin semblent peser dans la balance. Pour commencer, dans le milieu marin, les conditions

environnementales (*e.g.* les paramètres abiotiques tels que la luminosité, la température, la salinité, le pH) sont plus stables et homogènes que dans les milieux terrestres et dulçaquicoles. Deuxièmement, l'écosystème marin recense des interactions entre énormément de taxons différents (*e.g.* relations trophiques), dans l'écosystème terrestre ses interactions sont moindres. Ensuite, si on compare les deux milieux aquatiques, le milieu marin est moins turbide (Roy-Barman et al., 2011). Pour finir, une grande partie du milieu marin ne reçoit que peu de lumière solaire, certaines zones de la colonne d'eau se trouvent continuellement dans l'obscurité (*e.g.* zone bathypélagique) (Haddock et al., 2010 ; Widder, 2010 ; Roy-Barman et al., 2011). Une illustration de l'importance de la bioluminescence pour l'écosystème marin est la conservation d'yeux, parfois réduits, capables de détecter ces émissions de lumière par des organismes vivant à des profondeurs où le rayonnement solaire ne pénètre plus dans la colonne d'eau (Widder, 2010).

Dans le milieu marin, on retrouve une variation de l'abondance des espèces bioluminescentes. En effet, les organismes lumineux se trouvent principalement dans la zone mésopélagique (*i.e.* entre 200 et 1000 mètres de profondeur) (Warrant & Locket, 2004). La zone mésopélagique correspond également à la zone dysphotique, c'est-à-dire une zone à partir de laquelle l'intensité lumineuse issue du rayonnement solaire est inversement proportionnelle à la profondeur. À partir de 1000 mètres (*i.e.* la zone bathypélagique) les rayons du soleil ne pénètrent plus dans la colonne d'eau et on se retrouve dans une zone d'obscurité appelée également la zone

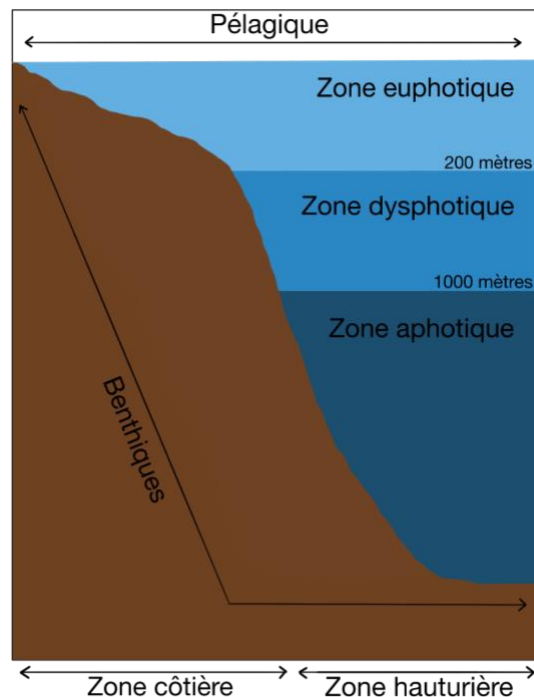


Figure 2: Représentation des différentes zones délimitées par le taux de pénétration de la lumière naturelle dans les eaux océaniques, ainsi que les zones benthiques et pélagiques (illustration modifiée de, Haddock et al., 2010 et Warrant & Locket, 2004)

aphotique (Figure 2). Dans cette zone, la seule source de lumière provient des organismes bioluminescents. De manière générale, les espèces bioluminescentes sont principalement des espèces planctoniques d'eaux profondes (*i.e.* deep sea en anglais), autrement dit vivant en dessous des 200 m de profondeur, plutôt que de surface ou benthiques (Warrant & Locket, 2004 ; Haddock et al., 2010).

Comme déjà évoqué, la bioluminescence dans le milieu marin possède une diversité impressionnante d'espèces et de mécanismes lumineux. Néanmoins, les propriétés spectrales, c'est-à-dire les longueurs d'onde émises, sont en majeure partie centrées autour de 470 nanomètres, ce qui correspond à une lumière de couleur bleue (Figure 3) (Haddock et al., 2010). Il s'agit en réalité de la longueur d'onde qui se propage le plus profondément dans la colonne d'eau. De ce fait, lorsque la lumière émise se trouve proche de 470 nanomètres, elle est mieux propagée et visible sur de plus grande distances (Herring & Widder, 2001 ; Widder, 2010). La plupart des espèces marines bioluminescentes sont pélagiques et l'émission de lumière bleue est prédominante. La lumière verte est la deuxième couleur la plus rencontrée en bioluminescence, mais concerne plus particulièrement les organismes benthiques et de la zone côtière (Widder, 2010). Dans ces zones ayant une grande turbidité, il y a une diminution des capacités de propagations des ondes lumineuse et les longueurs d'onde plus grandes (*e.g.* couleur verte) sont favorisées (Figure 4) (Widder, 2010 ; Mascarenhas & Keck, 2018). Les longueurs d'onde d'émission dans le violet, le jaune, l'orange et le rouge sont, quant à elles plus occasionnelles (Widder, 2010).

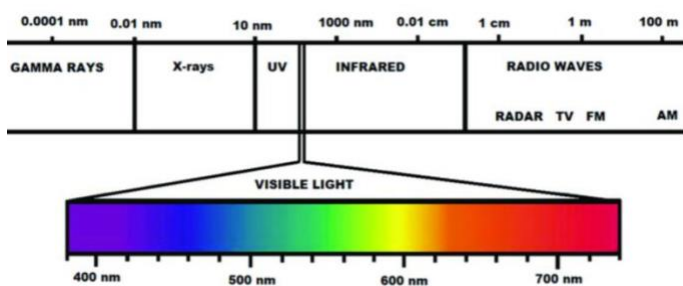


Figure 3 : Illustration du spectre de la lumière visible (modifiée d'Ailioaie & Litscher, 2020)

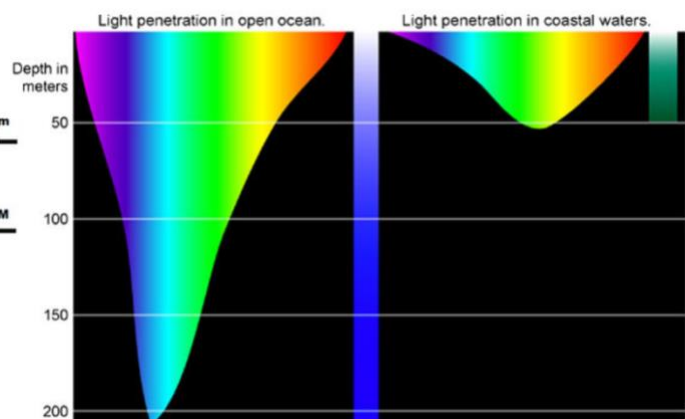


Figure 4 : Illustration de l'atténuation du spectre de la lumière visible en fonction de la profondeur pour les zones hauturière et côtière (Mascarenhas & Keck, 2018).

### 1.3 Fonctions de la bioluminescence dans le milieu marin

Dans le monde marin, différentes fonctions de la bioluminescence ont été mises en évidence. Ces différentes fonctions sont regroupées dans trois catégories, la défense, la prédation et la communication (Figure 5). Ces fonctions peuvent être présente de manière unitaire (*i.e.* seule une des fonctions est répertoriée pour l'animal) ou couplées (*i.e.* la bioluminescence à plusieurs fonctions pour un même organisme) (Haddock et al., 2010).














DEFENSE		<b>Startle</b>	Dinoflagellates, squid, stern-chaser myctophid
		<b>Counterillumination</b>	<b>Many:</b> crustaceans, fish, squid
		<b>Misdirection: smoke screen</b>	<b>Many:</b> crustaceans, polychaetes, scyphozoans, chaetognaths, squids, tube-shoulder fishes, ctenophores, siphonophores, larvaceans?
		<b>Distractive body parts</b>	<i>Octopoteuthis</i> squid, brittle stars, polychaetes, siphonophores
		<b>Burglar alarm</b>	Dinoflagellates, jellies, others?
		<b>Sacrificial tag</b>	Pelagic sea cucumbers, jellies, polychaetes
		<b>Warning coloration (deter settlers)</b>	Jellies, brittle stars? (tube worms, clams)
OFFENSE		<b>Lure prey or attract host (bacteria)</b>	Anglerfishes, siphonophores, cookie cutter shark, squid?
		<b>Lure with external light (evaluate habitat?)</b>	Sperm whale? megamouth shark?
		<b>Stun or confuse prey</b>	Squid, headlamp myctophid?
		<b>Illuminate prey</b>	Flashlight fish, dragonfishes
		<b>Mate attraction/recognition (swarming cue)</b>	Ostracods, <i>Japetella</i> octopus? lanternfish, flashlight fish, anglerfish? syllid polychaetes, others?
			

Figure 5 : Les fonctions connues de la bioluminescence dans le milieu marin, classées par catégories : la défense (en bleu), la prédation (en rose) et la communication (en gris) (Haddock et al., 2010).

#### 1.3.1 Défense

La fonction de défense est divisée en sept catégories. Pour commencer, on retrouve l'effet de surprise ou « startle effect ». L'organisme produit un flash lumineux, lorsque le prédateur se trouve proche de lui, ce qui l'effraie et le dissuade d'attaquer. Il y a également la stratégie de

l'écran de fumée (« smoke screen »), où les substances lumineuses sont excrétées dans l'environnement créant de ce fait une sorte de nuage lumineux. La visibilité du prédateur est alors réduite et la proie a la possibilité de disparaître. Une autre technique de défense pour la proie est le sacrifice d'une partie bioluminescente de son corps (« sacrificial lure » ou « distractive body parts ») (Haddock, 2010). Certains organismes sont, en effet, capables d'autotomie, c'est-à-dire une autoamputation d'une partie de son corps pour faciliter sa fuite, exemple du lézard qui sectionne sa queue pour échapper au prédateur (Clause & Capaldi, 2006). Dans le cas de la bioluminescence, ce leurre sacrificiel s'illumine et peut, pour certaines espèces, continuer à se mouvoir, ce qui focalise l'attention du prédateur et laisse le temps à la proie de fuir ou de se cacher. Une stratégie un peu plus complexe est le « burglar alarm ». Ici, la lumière émise par la proie permet d'illuminer son prédateur et de le rendre visible à un prédateur de niveau trophique supérieur. Dans la continuité de la stratégie du sacrifice d'une partie bioluminescente de son corps, on retrouve une stratégie de défense appelée le « sacrificial tag ». La partie lumineuse de la proie continue à émettre de la lumière après ingestion par le prédateur qui est transparent, la lumière émise rend alors visible l'individu aux yeux de ses propres prédateurs (Haddock et al., 2010). Au même titre qu'une coloration vive chez les organismes terrestres, les organismes bioluminescents peuvent avertir les prédateurs potentiels de leur toxicité, c'est ce qu'on appelle un rôle aposématique (« warning coloration ») (Mallefet, 2009, Haddock, 2010). Finalement, certains organismes peuvent également utiliser la bioluminescence pour mimer la lumière naturelle de la colonne d'eau, ce mécanisme est appelé la contre-illumination (« counterillumination »). Les organes impliqués dans l'émission de lumière, les photophores situés en position ventrale, leur permettent de dissimuler leurs ombres et de paraître invisibles aux yeux des prédateurs se trouvant plus bas dans la colonne d'eau (Haddock et al., 2010 ; Claes et al., 2014).

### 1.3.2 Prédation

La bioluminescence peut également avoir des rôles dans l'attaque des prédateurs. On retrouve notamment un exemple bien connu où la lumière permet d'attirer des proies (« lure prey »), il s'agit d'un phénomène particulièrement visible chez les poissons comme par exemple les poissons téléostéens de la famille des Lophiiformes. Certains organismes utilisent une variante de cette technique, en utilisant cette fois des sécrétions bioluminescentes dans le but d'attirer leurs proies. L'émission de lumière peut également être utilisée pour éblouir une proie et ainsi permettre au prédateur de faciliter son attaque. Et enfin, l'émission de lumière peut simplement

permettre à l'organisme d'éclairer son environnement et de ce fait de mieux visualiser ses proies (Haddock et al., 2010).

### 1.3.3 Communication

La dernière catégorie des fonctions de la bioluminescence en milieu marin est la communication. Bien connu dans le milieu terrestre, avec par exemple la parade nuptiale de la luciole, ce domaine est moins bien connu dans le milieu marin (Haddock et al., 2010). La bioluminescence peut donc avoir des rôles dans les comportements de reproduction à condition que ceux-ci aient la capacité de percevoir la bioluminescence (Mallefet, 2009). Un rôle relativement bien mis en évidence est le dimorphisme sexuel. Chez certains poissons, la présence de luminescence, le nombre de photophores, ... permettent la différenciation sexuelle. C'est notamment le cas pour le poisson *Photoplagios elongatus* dont le mâle émet de la lumière par transparence d'une zone au niveau de son flanc (Figure 6) (Herring, 2007).

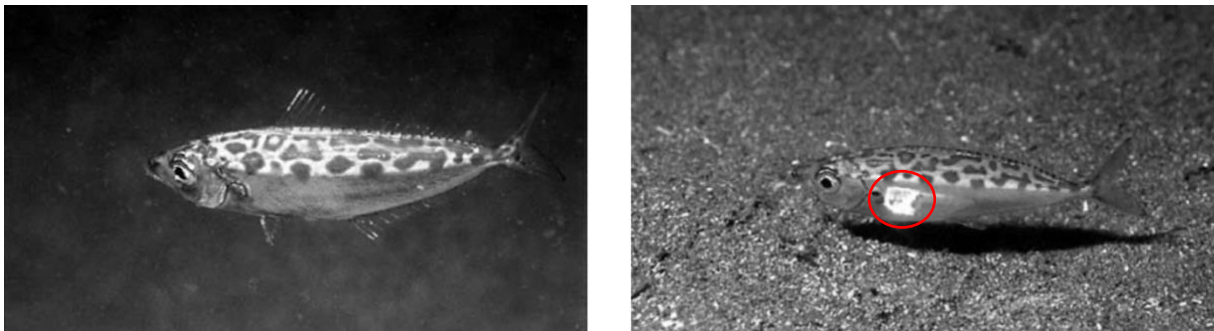


Figure 6 : Dimorphisme sexuel chez le poisson *P. elongatus*. A droite le poisson femelle ne présentant pas de bioluminescence, à gauche le poisson mâle dont la zone de bioluminescence est entourée en rouge (Herring, 2007).

## 1.4 Biochimie de la bioluminescence

### 1.4.1 Réaction chimique

La bioluminescence est le produit d'une réaction chimique résultant de l'oxydation d'un substrat, appelé luciférine, par une enzyme, appelée luciférase, ou par un complexe protéique stable, appelé photoprotéine. Plus précisément, l'oxydation d'une luciférine en oxyluciférine est catalysée par une luciférase, en présence d'oxygène (Harvey, 1952 ; Shimomura, 2006). Cette oxyluciférine est une molécule électroniquement excitée, qui pour revenir à un état fondamental, libère l'énergie accumulée sous la forme d'un photon (Wilson & Hasting, 1998 ; Shimomura, 2006 ; Widder, 2010).

Plus de 30 systèmes lumineux différents ont été découverts. Ceux-ci impliquent des substrats, des enzymes et des cofacteurs de différentes natures (Shimomura, 2006). Néanmoins, les différents systèmes découverts sont scindés en deux catégories, on retrouve d'un côté le système luciférine/luciférase (Figure 7A) et de l'autre les photoprotéines (Figure 7B) (Shimomura, 1985 ; Shimomura, 2006 ; Haddock et al. 2010).

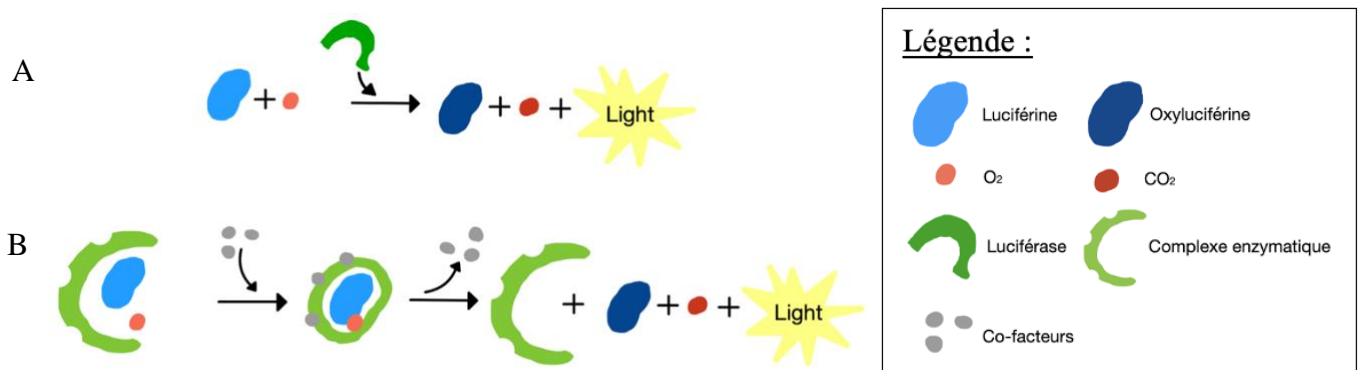


Figure 7: Schématisation des réactions de bioluminescence. A) pour le système luciférine/luciférase et B) pour les photoprotéines (Illustration originale inspirée de Shimomura, 1985).

#### 1.4.2 Système de bioluminescence : luciférine/luciférase et photoprotéine

Dans le cas de la bioluminescence issue du système luciférine/luciférase, il a longtemps été supposé que les luciférases étaient souvent spécifiques à l'espèce qui les produisaient. On sait maintenant que ce n'est pas forcément le cas. Certains organismes phylogénétiquement éloignés utilisent des luciférases homologues et à l'inverse, des organismes avec une phylogénie proche utilisent des luciférases non-homologues (Delroisse et al., 2021). En revanche, le même type de luciférine peut être utilisé comme substrat de la réaction lumineuse par des organismes de taxons différents, non apparentés ayant des luciférases différentes (Haddock et al., 2010 ; Renwart & Mallefet, 2013).

À ce jour, onze luciférines ont été mises en évidence, avec dans le milieu marin, quatre grandes familles de luciférines : la luciférine bactérienne, la luciférine de dinoflagellés, la varguline ou luciférine de *Cypridina* et la coelentérazine (Figure 8) (Renwart & Mallefet, 2013 ; Lau & Oakley, 2020).

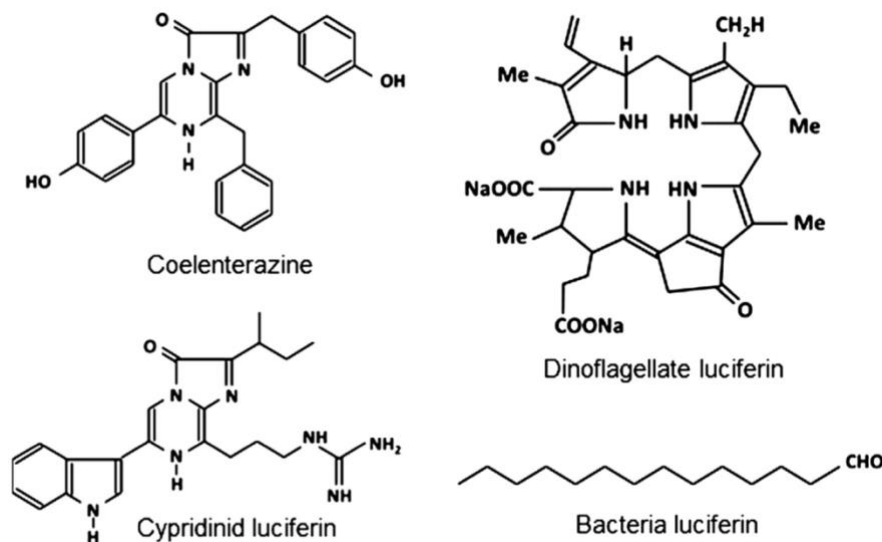


Figure 8: Illustration des quatre principales luciférines responsables des réactions de bioluminescence dans le milieu marin (Renward & Mallefet, 2013).

La luciférine la plus répandue dans le milieu marin est la coelentérazine (Haddock et al, 2010). Elle est, en effet, utilisée par des organismes appartenant à neuf embranchements : les radiolaires, les cnidaires, les cténophores, les céphalopodes, les crustacés, les appendiculaires, les échinodermes, les chétognathes et les chordés (Haddock et al., 2010 ; Lau & Oakley, 2020). Bien que la coelentérazine soit le substrat le plus largement répandu, la plupart des organismes ne la produisent pas eux-mêmes et l'acquisition de cette luciférine se fait le plus généralement via leurs alimentations, c'est une acquisition trophique. Les organismes connus capables de synthétiser la coelentérazine sont les copépodes, les cténophores et les crevettes décapodes présents dans les fonds marins (Lau & Oakley, 2020). Une équipe de recherche a en effet démontré chez la crevette *Systellaspis debilis*, que des œufs isolés ont des niveaux croissants de coelentérazine malgré leur dissociation de toute contribution maternelle potentielle (Thomson et al., 1995). Plus tard, une équipe japonaise a montré que le copépode *Metridia pacifica* nourri avec de la tyrosine et de la phénylalanine marquées au deutérium, présente une « synthèse de-novo » de la coelentérazine à partir de ces 3 acides aminés (Oba, 2009).

Cette hypothèse d'acquisition trophique est notamment mise en évidence par la présence de coelentérazine dans les tissus d'organismes non-bioluminescents, ce qui démontre la transmission de cette molécule dans le réseau trophique (Shimomura, 1987). De plus, des travaux ont pu expérimentalement mettre en lumière cette acquisition trophique chez une méduse (*Aequorea victoria*), une crevette (*Gnathophausia ingens*) et notamment chez une ophiure (*Amphiura filiformis*) sur laquelle on reviendra plus tard dans ce travail (Franck et al., 1984 ; Haddock et al., 2001 ; Mallefet et al., 2020).

Lorsque la coelentérazine est impliquée dans les réactions de bioluminescence, celle-ci émet une lumière dont la longueur d'onde se trouve entre 450 et 500 nanomètres, en soit une lumière bleue (Figure 3) (Fleiss & Sarkisyan, 2019).

On retrouve ensuite, un autre groupe de système bioluminescent, les photoprotéines. Une photoprotéine est une unité regroupant la luciférine, l'oxygène et un complexe enzymatique. La spécificité de ce système est la nécessité de la présence de cofacteurs, généralement des cations  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ , permettant un changement de conformation du complexe et la mise en contact des différents éléments, laissant donc *in fine* la réaction avoir lieu ((Figure 7B) (Shimomura, 1985 ; Haddock et al., 2010). La première photoprotéine a été découverte en 1961 par Shimomura chez une méduse du genre *Aequorea* et a été nommée l'aequorine (Shimomura, 2006).

De manière générale, la lumière émise par bioluminescence dépend des différents constituants de la réaction (luciférine, luciférase et photoprotéines). La couleur peut également être modifiée par la présence de protéines fluorescentes co-localisées avec le photocyte. Comme expliqué auparavant, lorsque l'oxyluciférine se trouve à un état excité, elle libère de l'énergie sous forme de photons pour revenir à son état fondamental. Lorsqu'une protéine fluorescente est présente, l'oxyluciférine lui transmet le photon émis. La protéine fluorescente ainsi excitée va relâcher l'énergie accumulée par l'intermédiaire d'un photon ayant sa propre longueur d'onde. Un exemple bien connu de ce phénomène est la bioluminescence chez la méduse *Aequorea victoria* dont la protéine fluorescente est la « Green Fluorescent Protein » (GFP) (Wilson & Hastings, 1998 ; Shimomura, 2006 ; Haddock *et al.*, 2010 ; Widder, 2010).

#### 1.4.3 Distribution

Comme dit précédemment, il existe une multitude de systèmes bioluminescents différents. À ce jour, il est estimé que la bioluminescence est un phénomène qui aurait évolué de manière indépendante au moins 94 fois. La bioluminescence est donc un exemple impressionnant de convergence évolutive (Figure 9) (Lau et Oakley, 2020).

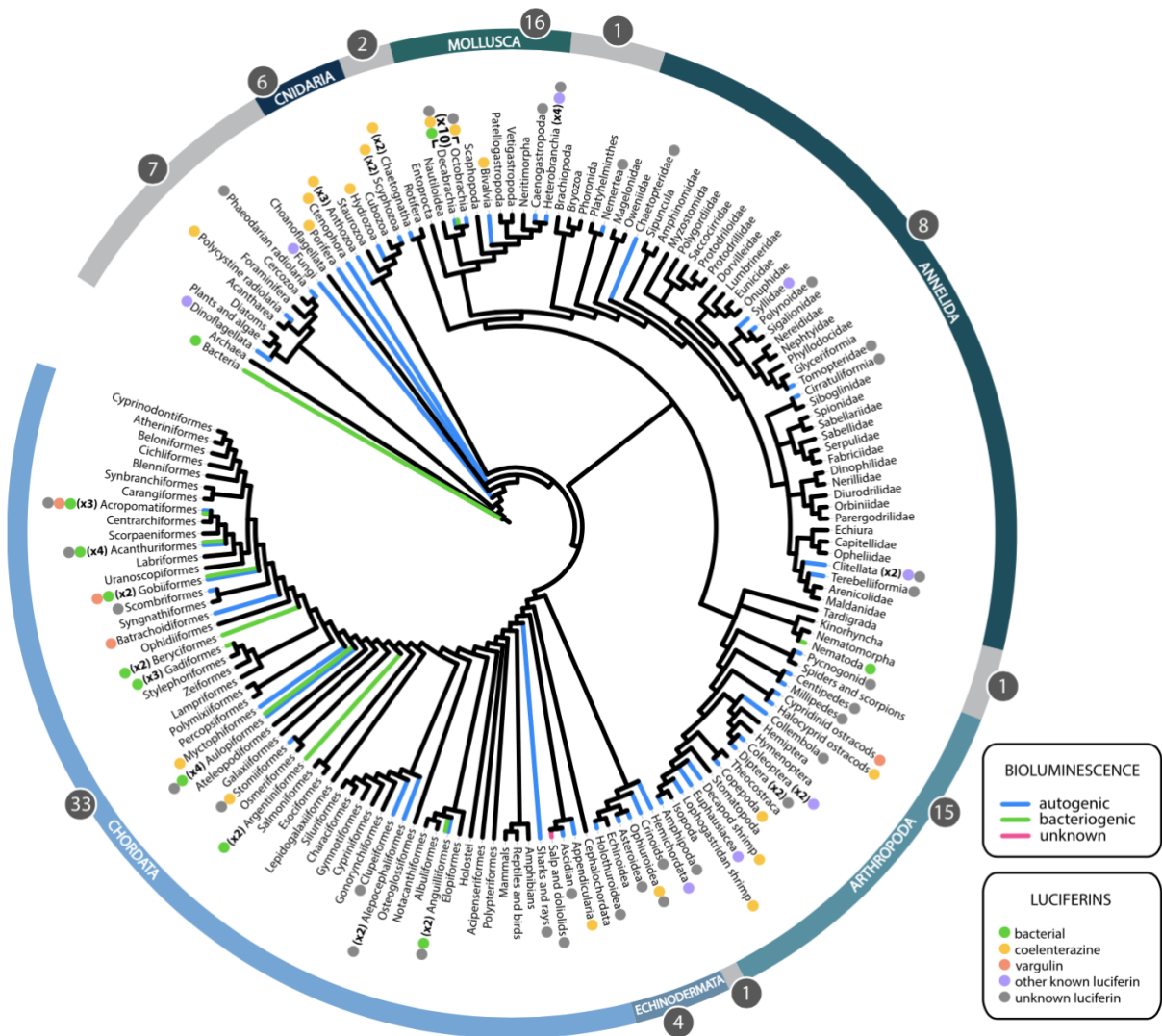


Figure 9 : Arbre phylogénétique mettant en évidence les différentes origines de la bioluminescence. Les branches en noir représentent les taxons où la bioluminescence n'est pas présente. Les branches bleues : les taxons où la bioluminescence est d'origine intrinsèque. Les branches vertes : les taxons où la bioluminescence est d'origine bactérienne (extrinsèque). Et en rose : les taxons où l'origine de la bioluminescence n'est pas encore connue. Les points de couleur font référence aux types de luciférines utilisées par le taxon (voir légende). Les arcs de cercle permettent de différencier certains embranchements et finalement, le nombre associé au nom de l'embranchement désigne le nombre d'origines indépendantes du phénomène de bioluminescence au sein de cet embranchement (formant un total de 94 fois) (Lau & Oakley 2020).

### 1.5 Bioluminescence intrinsèque et extrinsèque

La réaction de bioluminescence peut être de deux natures. Le cas le plus classique consiste en la production de lumière par l'organisme lui-même, on parle alors de bioluminescence intrinsèque (Haddock et al., 2010). Les substances chimiques à l'origine de la réaction de bioluminescence peuvent soit être libérées dans l'environnement (*i.e.* la colonne d'eau), soit la réaction s'effectue directement dans les tissus de l'organisme (*i.e.* photocytes). Ces photocytes peuvent se trouver isolés au sein du tissu de l'organisme ou regroupés dans un organe lumineux appelé photophore. À ces photophores, peuvent être associés des organes accessoires comme

des muscles ou des complexes optiques qui permettent alors de modifier l'émission initiale de lumière (Widder, 2010, Duchatelet et al., 2020).

La deuxième possibilité est ce qu'on nomme la bioluminescence extrinsèque. Dans ce cas de figure, la production de lumière est due à une symbiose entre un organisme et des bactéries bioluminescentes. Mais cela ne concerne qu'une minorité des espèces bioluminescentes. Les poissons téléostéens de la famille Lophiiformes (*i.e.* anglerfish) sont les individus les plus représentatifs (Haddock et al., 2010).

## 2 Échinodermes

### 2.1 Généralités

Les échinodermes sont un embranchement exclusivement marin composé de cinq classes : les Crinoïdes, les Holothuries, les Astérides, les Ophiures et les Échinoïdes. Parmi les échinodermes, seule la classe des échinoïdes ne contient pas d'espèce bioluminescente connue à ce jour (Mallefet, 2009, Delroisse et al. 2017a). En 2009, 121 espèces d'échinodermes étaient répertoriées comme bioluminescentes, depuis lors, ce chiffre ne fait qu'augmenter. Parmi cet embranchement, la majorité des espèces bioluminescentes font partie de la classe des ophiures (Figure 10) (Mallefet, 2009 ; Mallefet & Coubris, 2022). De manière générale, il est admis que la fonction de la bioluminescence chez les échinodermes est principalement un rôle défensif (Jones & Mallefet, 2013). Les échinodermes sont capables, en cas de stress, d'amputer mécaniquement un de leurs bras, ce phénomène s'appelle l'autotomie (Stöhr et al., 2012).

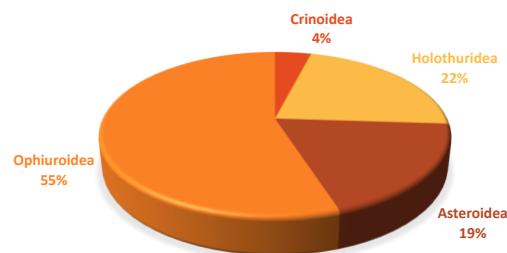


Figure 10 : Répartition de la bioluminescence chez les échinodermes (Coubris & Mallefet, 2022)

### 2.2 Ophiures

#### 2.2.1 Classification et description morphologique

La classe des ophiures est la plus importante en termes de nombre d'espèces parmi l'embranchement des échinodermes. En 2012, le nombre d'espèces décrites était de 2064. La classe des ophiures étant à ce moment-là composée de 16 familles dont les plus largement représentées sont les Amphiuridae (467 espèces), les Ophiuridae (344 espèces) et les

Ophiacanthidae (319 espèces) (Stöhr et al., 2012). Le nombre d'espèces découvertes continue d'augmenter, et actuellement, 2136 ophiures sont répertoriées (Stöhr et al., 2024)

Anatomiquement, l'ophiure est composée d'un disque central, faisant en moyenne 3 à 50 millimètres de diamètre, entouré de cinq bras. Mais certaines espèces ne respectent pas cette description et peuvent posséder jusqu'à 10 bras. La taille des bras est quant à elle de 2 à 20 fois le diamètre du disque. L'ouverture buccale se trouvant au centre du disque est composée d'autant de mâchoires que de bras (Stöhr et al., 2012). Les bras sont composés de plaques calcaires articulées entre elles. Les bras portent des podias et des piquants qui sont des prolongements squelettiques (Lawrence, 1987 ; Stöhr et al., 2012).

### 2.2.2 Habitat

Les ophiures sont ubiquistes, on les retrouve dans tous les océans, aussi bien en zones intertidales qu'en zones plus profondes. Au niveau de l'habitat, les ophiures sont une classe diversifiée et adaptée à différents modes de vie. Elles sont exclusivement benthiques, vivant enfouies dans un substrat (*i.e.* endofaune) ou sur le substrat (*i.e.* épifaune) meuble ou dur (*e.g.* roches ou corail) (Stöhr et al., 2012).

### 2.2.3 Alimentation

Le système digestif présent chez les ophiures est relativement simple avec un œsophage court, une poche stomacale et un anus absent. De par l'absence d'un anus, les ophiures sont sélectives d'un point de vue alimentaire afin se substantier en nutriments avec le moins de « déchets » possible (Stöhr et al., 2012). Pour ce faire, les ophiures s'aident de leurs bras pour attraper les nutriments et utilisent ensuite les podias et les piquants pour les acheminer vers la bouche. On retrouve néanmoins plusieurs stratégies alimentaires utilisées seules ou combinées en fonction des espèces : l'alimentation suspensivore où la nourriture est en suspension dans la colonne d'eau et l'alimentation dépositivore où les nutriments sont collectés à la surface du substrat. Ensuite, en fonction de la taille des particules alimentaires, on parlera d'ophiures microphages (< 1 mm) et d'ophiures macrophages (> 1 mm) (Lawrence, 1987 ; Stöhr et al., 2012).

### 2.2.4 Bioluminescence

Comme dit précédemment, la classe des ophiures est celle présentant le plus d'espèces bioluminescentes au sein des échinodermes. En effet, en 2009, sur 222 espèces testées, plus de 77 se trouvent être bioluminescentes (Mallefet, 2009). La bioluminescence chez les ophiures a été mise en évidence il y a déjà plusieurs années (Viviani, 1805 ; Harvey, 1952) et des études ont mis l'accent sur la fonction défensive chez ces organismes (Mallefet, 2009). Des expériences menées sur cinq espèces d'ophiures ont plus particulièrement mis en évidence les

comportements de « startle effect », de leurre sacrificiel, de « burglar alarm » ainsi qu'un rôle aposématique (Mallefet, 2009 ; Jones & Mallefet, 2013). Chez les ophiures, l'activité bioluminescente est de nature intrinsèque, avec des photocytes localisés de diverses manières en fonction de l'espèce (Delroisse et al., 2017b).

### 3 *Amphiura filiformis*

#### 3.1 Généralités

*Amphiura filiformis* est une ophiure de la famille Amphiuridae possédant cinq bras très longs (*i.e.* jusqu'à 10 fois le diamètre de son disque), dont le disque peut avoir jusqu'à 10 millimètres de diamètre et avec une coloration rougeâtre (Hill & Wilson, 2009).

Cette espèce est distribuée en Europe, depuis l'ouest de la Norvège jusqu'à la mer Méditerranée dans des profondeurs allant jusqu'à 200 mètres (Rosenberg & Lundberg, 2004). Néanmoins, comme le montrent les données issues de l'Ocean Biodiversity Information System, la majorité des individus vivent entre 20 et 50 mètres de profondeur. La base de données des recensements encodés dans l' « Ocean Biodiversity Information System » indique également un étalement de l'air de répartition au niveau de la côte ouest africaine (Figure 11) (OBIS,2024).



Figure 11 : Distribution de l'espèce *Amphiura filiformis*. Chaque point représente la localisation d'un recensement de l'espèce entre 1800 et 2022 (OBIS, 2024).

Cette espèce vit le disque enfoui dans quatre à huit centimètres de sédiments meubles et se nourrit en laissant deux bras à l'interface eau/sédiment (Figure 12A) (Rosenberg & Lundberg, 2004 ; Hill & Wilson, 2009). D'un point de vue alimentaire, cette

ophiure est capable d'adapter son mode de capture en fonction de la vitesse du courant dans la colonne d'eau. Lorsque le courant possède une vitesse inférieure à 0,5 centimètre par seconde, elle utilise ses bras pour collecter des nutriments présents à la surface du substrat (*i.e.* dépositivore), le reste du temps son régime est suspensivore (Rosenberg & Lundberg, 2004). Le comportement alimentaire de cette espèce a principalement lieu la nuit, et ce, en lien avec la photopériode (Rosenberg & Lundberg, 2004). Il a en effet été mis en évidence que malgré l'absence d'organes oculaires, cette espèce est capable de détecter la lumière résiduelle de la colonne d'eau. Cette action est rendue possible grâce à la présence de protéines photosensibles appelées opsines. Ces opsines ont été mises en évidence au niveau des podias et des piquants de l'ophiure (Delroisse et al., 2014).

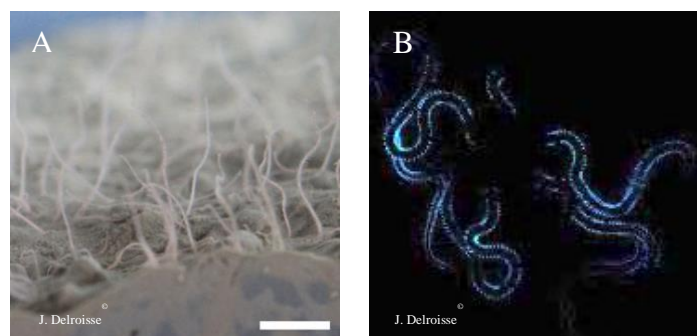


Figure 12 : A) ophiures *Amphiura filiformis* avec leurs bras à l'interface eau/sédiment (échelle 1 cm) ; B) bioluminescence d'*Amphiura filiformis* à 475 nm

*A. filiformis* est une espèce prédatée aussi bien par des poissons démersaux que des crustacés, ces principaux prédateurs sont la limande (*Limanda limanda*) et la langoustine (*Nephrops norvegicus*). Les ophiures, et donc *A. filiformis*, étant capables d'autotomie et de régénération des tissus, la prédation sublétale est fortement répandue chez cette espèce et près de 80 % des bras présentent des signes de tissus régénérés (Rosenberg & Lundberg, 2004, Dupont & Thorndyke, 2006). La régénéscence des bras chez cette espèce est relativement rapide, avec un taux de régénéscence de 0,99 mm par semaine. La régénéscence du membre commence par une croissance en longueur à partir d'un bourgeon. Ce début de croissance fournis un fin filament dont les tissus sont non différenciés (figure 13A). La partie proximale fini par progressivement se différencier avec l'apparition de podias et de piquants (figure 13B) (Biressi et al., 2009). Il a également été mis en évidence la présence d'un compromis entre l'élongation du bras et la différenciation. Si le bras est sectionné à proximité de l'extrémité distale, il y aura d'avantage d'énergie allouée à la différenciation afin que le bras récupère rapidement ses capacités sensorielles. Si le bras est sectionné proche du disque (*i.e.* extrémité proximale du bras), il n'a plus la capacité d'attendre la colonne d'eau et donc de participer au

comportement alimentaire. De ce fait, l'élongation du bras sera cette fois-ci favorisée au détriment de la différenciation (Dupont & Thorndyke, 2006).

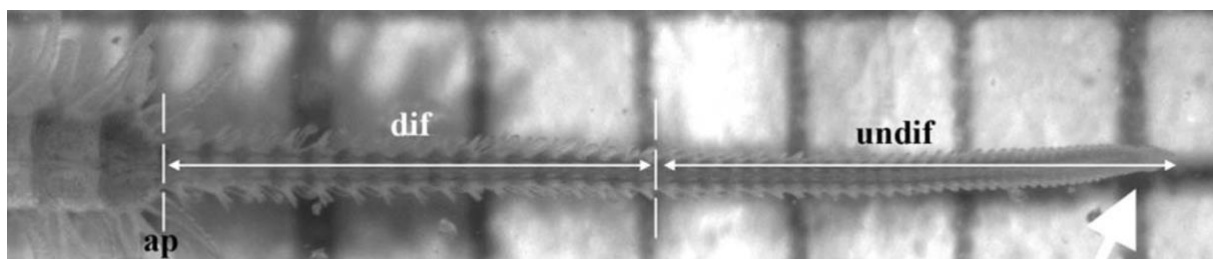
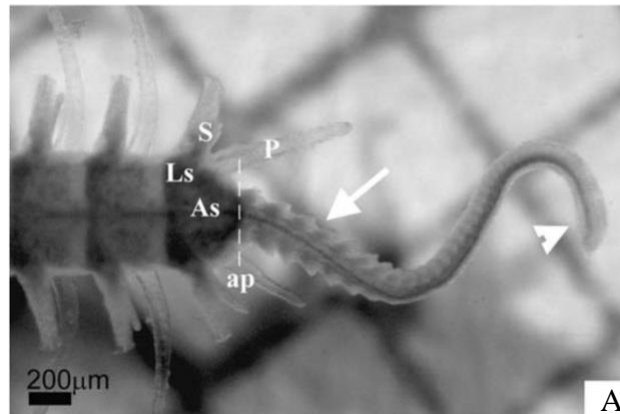


Figure 13 : Régénérescence du bras chez *A. filiformis* après amputation. A) Régénérescence non différenciée du bras à partir de la zone d'amputation. La flèche indiquant une zone où la régénérescence commence à se différencier mais sans pour autant distinguer clairement les segments, piquants et podias formant la structure du bras. La pointe de flèche indique l'extrémité distale du bras qui est quant à lui totalement indifférencié. B) Bras présentant deux zones distinctes dans la partie du bras en cours de régénérescence : une partie différenciée (*dif*) sur laquelle on peut voir la présence de podias et de piquants et une partie non différenciée (*undif*). La flèche indique l'extrémité distale du bras  
*ap* indique le point où à eu lieu l'amputation, *As* la face aborale, *Ls* la scute latérale du bras, *P* le podia, et *S* le piquant (Biressi et al., 2009).

### 3.2 Bioluminescence

La bioluminescence de *A. filiformis* a été mise en évidence pour la première fois en 1985. Sa bioluminescence est caractérisée par une émission de lumière de couleur bleue dont la longueur d'onde maximale est de 475 nanomètres (Figure 12B) (Shimomura, 2006). Comme pour l'ensemble des ophiures bioluminescentes, cette activité est de nature intrinsèque. Pour *A. filiformis*, la lumière est émise au niveau du bras lorsque celui-ci est mécaniquement stimulé. Les photocytes sont situés à la base des piquants ainsi que l'extrémité distale du bras (*i.e.* le « tips ») (Delroisse et al., 2017b). Chez cette espèce, la réaction de bioluminescence utilise la coelentérazine comme substrat et la réaction est catalysée par une luciférase homologue à celle du cnidaire *Renilla reniformis* (Delroisse et al., 2017a ; Mallefet et al., 2020). Cette activité luciférasique se concentre à la base du piquant (Figure 14). Les photocytes présents dans le piquant sont associés à des structures neuronales qui permettent le déclenchement de l'émission de lumière (Delroisse et al. ; 2017a). En effet, la bioluminescence chez *A. filiformis* est sous contrôle nerveux, l'acétylcholine est le neurotransmetteur permettant le déclenchement de

l'émission de lumière à des concentrations entre  $10^{-6}$  et  $10^{-4}$  mol/L. D'autre part, il a été démontré que des récepteurs nicotiques et muscariniques sont impliqués dans le contrôle de l'émission de lumière chez cette espèce (Dewael & Mallefet, 2002).

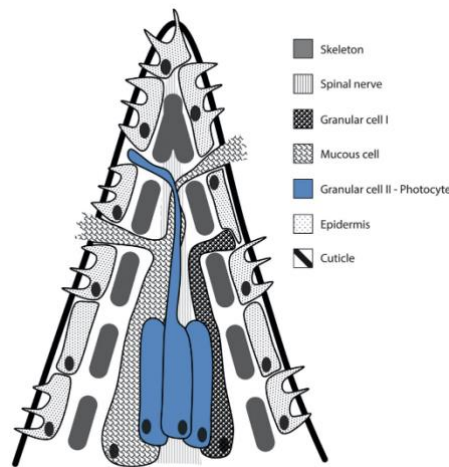


Figure 14 : Schéma d'une coupe longitudinale d'un piquant d'*A. filiformis* (Delroisse et al., 2017a).

### 3.2.1 Acquisition trophique

Comme évoqué plus haut, la coelentérazine est une molécule retrouvée comme substrat chez un grand nombre d'espèces, mais néanmoins synthétisée par très peu d'entre elles, ce qui conduit à l'hypothèse de l'acquisition trophique (Lau & Oakley, 2020). Cette hypothèse a pu être mise en évidence pour plusieurs espèces.

Une étude menée par Haddock en 2001 a montré que les capacités lumineuses de la méduse *A. victoria* étaient dépendantes d'un apport alimentaire en coelentérazine. Les méduses maintenues en captivité avec un régime sans coelentérazine étaient incapables de produire de la lumière. Ces cnidaires ont ensuite été nourris avec des proies bioluminescentes contenant de la coelentérazine induisant la bioluminescence chez ces méduses (Haddock et al., 2001). La même approche a permis de mettre en évidence la nécessité d'un apport exogène de coelentérazine pour que la crevette *Gnathopausia inges* afin qu'elle maintienne ses capacités lumineuses (Frank et al., 1984). Ce phénomène d'acquisition trophique est également présent pour d'autres luciférines. La bioluminescence chez le poisson *Porichthys notatus* viendrait également d'un apport exogène de luciférine de copépode, plus précisément l'ostracode *Vargula tsujii*. Cette espèce de poisson téléostéen, vit dans l'est de l'océan Pacifique, répartie en deux populations principales, au nord et au sud. Or les poissons qui vivent au sud sont bioluminescents contrairement à ceux du nord qui ne le sont pas. La population au sud consomme en réalité un ostracode bioluminescent, *V. tsujii*, lui fournissant la luciférine contrairement à la population vivant au nord pour laquelle l'ostracode ne fait pas partie du

régime alimentaire, dû à son absence dans cette aire de distribution. Lorsqu'un poisson non-bioluminescent venant de la baie située au sud est nourri avec un ostracode luminescent, celui-ci est alors capable d'émettre de la lumière (Warner et al., 1980). Des résultats similaires avaient également été mis en évidence quelque années auparavant, mettent en évidence une récupération des capacités lumineuse de *P. notatus* provenant d'une population non lumineuse après l'administration forcée de luciférine de *Cypridina* ou de luciférine provenant de population lumineuse de *P. notatus* (Barnes et al., 1973).

Plus récemment, l'acquisition trophique de la coelentérazine a été montrée chez l'ophiure *Amphiura filiformis*. En effet, lorsque l'espèce est maintenue en captivité pendant plusieurs mois et nourrie avec une nourriture dépourvue de coelentérazine, ses capacités lumineuses diminuent. Cette perte significative des capacités lumineuses est observée après cinq mois de captivité, sans apport exogène de coelentérazine. Lors d'une approche plus approfondie, on constate que c'est la concentration en luciférine au sein de l'organisme qui diminue tandis que la luciférase reste stable au cours du temps. À l'inverse, lorsque la coelentérazine est à nouveau présente dans l'alimentation de l'ophiure, on remarque une récupération des capacités lumineuses et une augmentation de la concentration en coelentérazine dans les tissus de l'animal. La récupération des capacités lumineuses est rapide et s'opère dès le troisième jour après l'apport unique de coelentérazine (Mallefet et al., 2020).

# Objectifs du mémoire

Comme dit précédemment, l'hypothèse de l'acquisition trophique de la coelentérazine chez *Amphiura filiformis* a d'ores et déjà pu être mise en évidence (Mallefet et al., 2020). Dans le cadre de ce mémoire, l'objectif principal est d'approfondir la compréhension du mécanisme d'acquisition trophique de la coelentérazine chez *A. filiformis*, à travers plusieurs approches expérimentales.

Premièrement, un suivi de la récupération des capacités lumineuses après un ajout unique de coelentérazine à leur alimentation des ophiures sera réalisé (*i.e.* période d'induction). Pour évaluer cette récupération, trois mesures luminométriques seront effectuées sur l'organisme : l'émission de lumière totale par dépolarisation au KCl, la concentration en coelentérazine et l'activité enzymatique de la luciférase. Ces mesures seront réalisées avant l'induction et ensuite à différents moments après celle-ci ( $t = 3, 24, 48, 69, 192, 240$  et  $384$  heures). Les expériences seront menées non seulement sur des organismes de l'espèce *A. filiformis* mais également sur une espèce sympatrique non-bioluminescente, *Amphiura chiajei*, utilisée comme contrôle.

Deuxièmement, nous analyserons l'autofluorescence de la coelentérazine. L'objectif est de visualiser la récupération et la localisation de la coelentérazine depuis le contenu stomacal jusqu'aux photocytes situés à la base des piquants et à l'extrémité distale du bras, les zones d'émission lumineuse chez *A. filiformis*. Cette analyse sera réalisée par excitation lumineuse ( $\lambda_{\text{excitation}} = 484 \text{ nm}$ ) et détection de l'émission verte en résultant ( $\lambda_{\text{émission}} = 538 \text{ nm}$ ).

Enfin, pour vérifier une possible colocalisation entre la luciférase et son substrat, un test d'immuno-histo-fluorescence sera réalisé. Il s'agira ici de réaliser un immunomarquage indirect à l'aide d'un premier anticorps dirigé contre la luciférase du cnidaire *Renilla reniformis*, qui est homologue à celle de notre sujet d'étude. Un deuxième anticorps sera ensuite utilisé, celui-ci étant dirigé contre le premier anticorps. Ce deuxième anticorps ayant la particularité d'être couplé à un fluorochrome, permettant sa visualisation histologique.

# Matériel et méthodes

## 1 Collecte et maintien en captivité

Les ophiures utilisées pour la réalisation de cette étude proviennent de la station de recherche marine de Kristineberg en Suède. Après leur collecte, ces spécimens ont été transportés en Belgique et ont été hébergés dans les laboratoires de l'Université Catholique de Louvain pendant 22 mois.

En Belgique, les ophiures sont conservées dans des aquariums où les conditions environnementales sont soigneusement régulées pour simuler leur habitat naturel autant que possible. L'eau des aquariums est maintenue à une température stable d'environ 10°C, et la salinité est ajustée pour se situer entre 30 et 35‰, ce qui reflète les conditions maritimes typiques de leur milieu d'origine. Les aquariums sont situés dans une pièce unique contrôlée, où la photopériode est réglée pour simuler un cycle naturel de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Pour simplifier le nourrissage et les observations, la phase nocturne commence à 14 heures. Les ophiures sont nourries une fois par semaine avec une nourriture spécifique à granulométrie fine pour poissons d'eau douce. Cette approche alimentaire est choisie pour éviter l'apport exogène de coelentérazine, qui pourrait influencer les résultats expérimentaux.

Pour les expériences décrites dans ce mémoire, les ophiures sont sélectionnées aléatoirement parmi les individus dont les capacités lumineuses sont très faibles, un état qualifié de « déplété ». Ces individus présentent une faible luminescence due à une quasi-absence de coelentérazine dans leurs tissus, ce qui est essentiel pour évaluer la récupération des capacités lumineuses. Les ophiures déplétées sont placées dans des cylindres de PVC remplis de vase pour créer un environnement standardisé, et ces cylindres sont ensuite regroupés dans un même aquarium pour garantir des conditions de vie homogènes. Deux espèces d'ophiures sont utilisées dans cette étude : *Amphiura filiformis*, l'espèce d'intérêt principal, et *Amphiura chiajei*, une espèce non lumineuse sympatrique. Cette dernière est employée comme contrôle pour fournir une comparaison pertinente avec l'espèce d'intérêt, permettant ainsi d'isoler les effets spécifiques de la coelentérazine sur les capacités lumineuses des ophiures étudiées.

## 2 Induction

Avant le début de l'étude, les ophiures sélectionnées sont placées dans un état dit "déplété", caractérisé par une réduction significative de leurs capacités lumineuses naturelles. Cette phase

déplétée est essentielle pour évaluer correctement la récupération de ces capacités après une stimulation.

Pour étudier la récupération des capacités lumineuses de *A. filiformis*, une étape d'induction est mise en place. Cette induction est réalisée en fournissant un apport exogène de coelentérazine, un composé crucial pour la production de lumière chez cette espèce. Concrètement, au cours de la procédure de nourrissage, un ajout unique de coelentérazine est incorporé à la nourriture distribuée.

Le processus d'induction commence par la préparation d'un mélange spécifique de nourriture pour poissons d'eau douce, d'huile de foie de morue et de coelentérazine. Cette préparation est réalisée la veille de l'induction afin d'assurer une homogénéité maximale du mélange et une dissolution complète de la coelentérazine dans le mélange alimentaire (Annexe 1). La concentration en coelentérazine dans l'aliment est déterminée en utilisant la même technique que celle employée pour la quantification de la coelentérazine dans les bras et les disques des ophiures. Celle-ci montre une concentration de 1368,74 ng de coelentérazine par gramme de nourriture.

### 3 Échantillonnage et dissection

La veille de l'induction et à des intervalles de temps prédéfinis après l'induction ( $t = 3, 24, 48, 69, 192, 240$  et  $384$  heures), un total de 7 ophiures sont prélevées pour chaque point temporel, dont 6 *A. filiformis* et 1 *A. chiajei*. En tout, 48 individus de *A. filiformis* et 8 de *A. chiajei* ont été récoltés au cours de l'étude.

Les ophiures prélevées sont immergées dans une solution de  $MgCl_2$  à 3,5%, un narcotique bien établi pour les invertébrés marins (Dewael & Mallefet, 2002 ; Dupont & Thorndyke, 2006 ; Williams & Van Syoc, 2007). Cette solution permet l'anesthésie des ophiures en l'espace de 3 minutes, facilitant ainsi la manipulation des ophiures sans provoquer de flash lumineux, ce qui est crucial pour éviter la consommation de coelentérazine et garantir des mesures précises.

Une fois anesthésiées, les cinq bras de chaque ophiure sont soigneusement sectionnés aussi près que possible du disque central. Après la découpe, chaque bras est mesuré et pesé avant d'être attribué à une analyse précise. Trois types d'analyses luminométriques sont alors réalisées. Tout d'abord, la mesure de l'émission totale de lumière est effectuée en stimulant les bras avec du KCl afin d'évaluer la luminescence totale produite. Ensuite, la concentration en coelentérazine dans les bras est quantifiée, permettant de déterminer la quantité de cette substance présente

dans les tissus. Enfin, l'activité enzymatique de la luciférase également appelée activité luciférasique est mesurée. Pour compléter l'évaluation des capacités lumineuses des ophiures, deux autres types d'analyses sont effectués. En premier lieu, une visualisation histologique de la coelentérazine est réalisée. Cette analyse utilise la technique d'autofluorescence pour détecter et localiser la présence de coelentérazine dans les bras et les piquants des ophiures. Ensuite, après un traitement d'immunomarquage, une autre analyse histologique est menée pour visualiser la luciférase. Cette méthode permet de localiser et d'évaluer la présence de cette enzyme spécifique dans les tissus des ophiures. Ces analyses complémentaires fournissent des informations cruciales sur la distribution des molécules d'intérêt dans les tissus des organismes étudiés. Le disque central de l'ophiure est également récupéré et pesé afin d'en mesurer la concentration de coelentérazine. Cette étape permet de vérifier l'absorption de coelentérazine exogène par l'animal. (Figure 15)

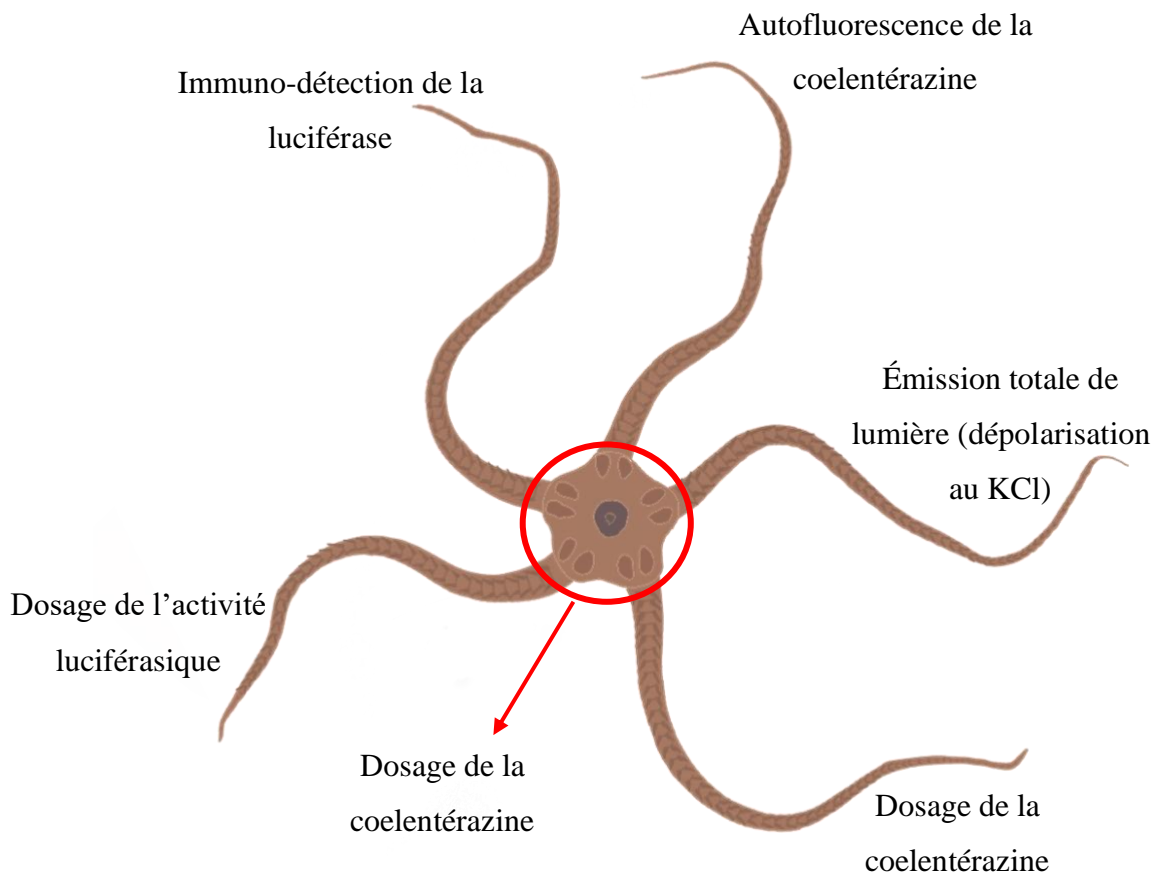


Figure 15 : Schématisation de l'ensemble des analyses réalisées par organismes

Le bras destiné à la dépolariation au KCl est placé dans un tube contenant 500 µl d'eau de mer artificielle (ASW : 400 mM NaCl, 9,6 mM KCl, 52,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 9,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 27,7 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris ; pH = 8,2). Les bras prévus pour les mesures de coelentérazine et d'activité luciférasique, ainsi que le disque, sont rapidement congelés à -20°C pour préserver

l'intégrité des molécules d'intérêt et faciliter l'extraction des composants ultérieurement. Pour les analyses histologiques, le bras destiné à la visualisation de la coelentérazine est placé dans un Eppendorf contenant du  $MgCl_2$  afin de maintenir l'effet anesthésique jusqu'à l'étape de montage et éviter la formation de « nœud » en raison d'une activité nerveuses et musculaire persistante. Le bras destiné à la visualisation de la luciférase est fixé par immersion dans un Eppendorf contenant du tampon phosphate salin (PBS : 123 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 12,6 mM  $Na_2HPO_4$ , 1,7 mM  $KH_2PO_4$ ; pH = 7,7) et 4% de paraformaldéhyde (PFA) pendant deux heures. Après fixation, cet échantillon est transféré dans un autre Eppendorf contenant du PBS pour une conservation à long terme.

## 4 Évaluation des capacités lumineuses

Dans le cadre des analyses luminométriques, le luminomètre FB12 de Berthold Detection System a été utilisé pour quantifier les propriétés lumineuses des échantillons. Cet appareil permet de mesurer deux paramètres essentiels : l'intensité maximale de lumière ( $L_{max}$ ), exprimée en unités relatives de lumière par seconde (RLU/s), et la quantité totale de lumière ( $L_{tot}$ ), mesurée en unités relatives de lumière (RLU). Le luminomètre FB12 est connecté à un ordinateur, ce qui facilite l'enregistrement et la visualisation des données via le logiciel dédié, le « FB12 Sirius PC Software ». Ce logiciel permet d'examiner en temps réel le résultat des mesures, ainsi que de sauvegarder les données pour une analyse ultérieure.

Pour minimiser les interférences et le bruit de fond qui pourraient affecter la précision des mesures, le luminomètre est utilisé dans un environnement contrôlé. La pièce où se déroule les analyses est soigneusement isolée de toute source de lumière ambiante, garantissant ainsi des conditions de mesure optimales. Cette configuration permet d'assurer l'exactitude et la fiabilité des données recueillies, en réduisant les risques d'erreurs systématiques liées à des influences extérieures.

### 4.1 Calibration du luminomètre

Chaque appareil possédant une sensibilité propre, il est important de calibrer le luminomètre utilisé. La calibration permet notamment de convertir les données dont l'unité principale est le RLU en une quantité de photons émis ou quanta (q). Pour ce faire, on utilise une source lumineuse d'intensité connue.

Le luminomètre a ici été calibré à partir d'une source lumineuse radioactive (Beta light, Saunders Technology, Hayes, R.-U.) à 470 nm. S'agissant d'une source radioactive, il est

important de tenir compte de la décroissance de l'intensité lumineuse au cours du temps. L'intensité lumineuse de la source au moment des analyses est obtenue à partir de la formule suivante :

$$I = I_0 \times e^{-k\Delta t}$$

$I_0$  étant l'intensité initiale de la source ;  $k$  la constante de décroissance et  $\Delta t$  le temps écoulé depuis la mesure de l'intensité initiale

Dans notre cas :

$$I (Mq/s) = 119,7 \times e^{-0,056\Delta t}$$

$\Delta t$  étant le temps écoulé depuis le 1<sup>er</sup> avril 1971 jusqu'à la date du 1<sup>er</sup> juillet 2021, soit 50,1666 ans. L'intensité de la source est donc de 7,211 Mq/s.

Afin de calibrer le luminomètre, qui rappelons-le fourni des données en RLU et RLU/s, la source lumineuse est placée dans celui-ci afin d'enregistrer l'émission de lumière sur une durée de 3 minutes. Cette mesure est réalisée 2 fois, une fois avec un filtre 0,1% et une dernière fois avec un filtre 1%. Ainsi, en travaillant avec le filtre 1%, 1 RLU/s = 1696,71 q/s et avec le filtre 0,1% 1 RLU/s = 15 757,14 q/s. Ces valeurs seront utilisées ultérieurement afin de convertir les données brutes issues du luminomètre.

#### 4.2 Émission totale de lumière : dépolarisation au KCl

Le KCl est un composé couramment utilisé dans les études de bioluminescence chez les échinodermes pour déclencher des réactions de bioluminescence. Il agit en provoquant une dépolarisation des membranes cellulaires, ce qui est particulièrement pertinent pour *A. filiformis* où il met en évidence le contrôle nerveux des réactions bioluminescentes (Dewael & Mallefet, 2002).

Comme mentionné précédemment, le bras sélectionné pour cette analyse a été préalablement immergé dans un tube contenant 500 µl d'eau de mer artificielle (ASW). Cette préparation assure que le bras est dans un environnement contrôlé et proche des conditions naturelles avant l'introduction du KCl. Le tube contenant le bras est ensuite inséré dans la chambre d'analyse du luminomètre. Une seringue contenant 500 µl d'une solution de KCl (400 mM KCl, 52,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 9,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 27,7 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris ; pH = 8,2) est ensuite placée dans la chambre d'injection du luminomètre. Une fois tous les éléments en place, l'enregistrement des données est déclenché pour une durée de 3 minutes et 10 secondes. Après 10 secondes, temps destiné à la mesure du bruit de fond, le KCl est injecté dans le tube contenant

le bras (Figure 16) (Mallefet et al., 2020). Cette injection déclenche la réaction de dépolarisation des membranes, entraînant une émission de lumière que le luminomètre mesure. La mesure de l'émission de lumière totale ( $L_{tot}$ ) en est ensuite enregistrée pour chaque échantillon.

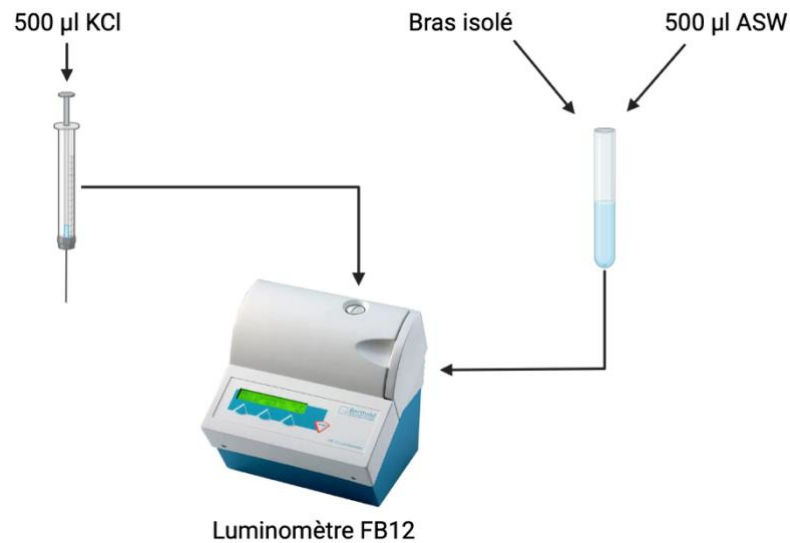


Figure 16 : Schématisation des étapes pour la dépolarisation au KCl (illustration originale)

Les données collectées seront ultérieurement converties et standardisées en quanta par gramme de tissu (q/g), ce qui permettra d'obtenir une mesure quantifiée de la bioluminescence relative à la masse des tissus analysés (Annexe 2).

### 4.3 Concentration en coelentérazine

Afin de déterminer la concentration de coelentérazine dans les échantillons, une réaction luminométrique est mise en œuvre en utilisant la coelentérazine présente dans l'échantillon et une solution de luciférase de *Renilla*, qui est utilisée en excès. Cette mesure est effectuée dans la chambre d'analyse d'un luminomètre.

Pour préparer la solution de luciférase, on commence par diluer 4 µl de luciférase de *Renilla* (fournie par la société Prolume Ltd, USA), préalablement diluée à 2 g/l dans une solution tampon (10 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 1% de BSA (albumine sérique bovine) ; pH = 7,4). Cette solution est ensuite mélangée avec 196 µl de tampon Tris (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH = 7,4) dans un tube, puis vortexée pour assurer une homogénéisation complète. Le mélange est transféré dans une seringue pour faciliter l'injection dans le luminomètre.

Pour quantifier la coelentérazine présente dans les tissus des ophiures (bras ou disque), il est essentiel d'extraire cette substance avant de procéder à l'analyse luminométrique. Étant donné que la coelentérazine est sujette à une oxydation rapide lorsqu'elle est exposée à l'air libre et à la lumière, l'extraction doit être réalisée dans des conditions d'obscurité et juste avant

l'enregistrement des données pour préserver l'intégrité de la coelentérazine. Le tissu préalablement congelé est placé dans un Eppendorf contenant 200  $\mu$ l de méthanol froid. Le tissu est ensuite broyé à l'aide d'un micro-pilon pour obtenir une solution homogène. Cette opération est effectuée tout en maintenant l'Eppendorf sur de la glace afin de garantir l'intégrité de la coelentérazine. Le broyage dans le méthanol a pour effet d'inactiver la luciférase présente dans les tissus, ce qui empêche toute réaction non désirée entre l'enzyme naturellement présente dans les tissus et son substrat.

Une fois l'extraction effectuée, 5  $\mu$ l de cet extrait sont transférés dans un tube contenant 195  $\mu$ l de tampon Tris. Ce mélange est vortexé pour assurer une homogénéisation complète. Le tube préparé est ensuite placé dans la chambre d'analyse du luminomètre, tandis que la seringue contenant la solution de luciférase est insérée dans la chambre d'injection du luminomètre (Figure 17) (Shimomura, 2012).

L'enregistrement des données est lancé pour une durée totale de 3 minutes et 10 secondes. Comme pour les mesures d'émission totale de lumière par dépolarisation au KCl, les 10 premières secondes sont consacrées à la mesure du bruit de fond. Après ce délai, la solution de luciférase est injectée dans le tube contenant l'extrait de tissu. L'émission totale de lumière ( $L_{tot}$ ) est alors mesurée en unités relatives de lumière (RLU). Cette valeur de  $L_{tot}$  est utilisée pour déterminer la concentration en coelentérazine par gramme de tissu (ng/g), en se basant sur le fait que 1 ng de coelentérazine émet  $2,52 \times 10^{11}$  photons (ou quanta) lors de sa réaction avec la luciférase de *Renilla* (Annexe 3).

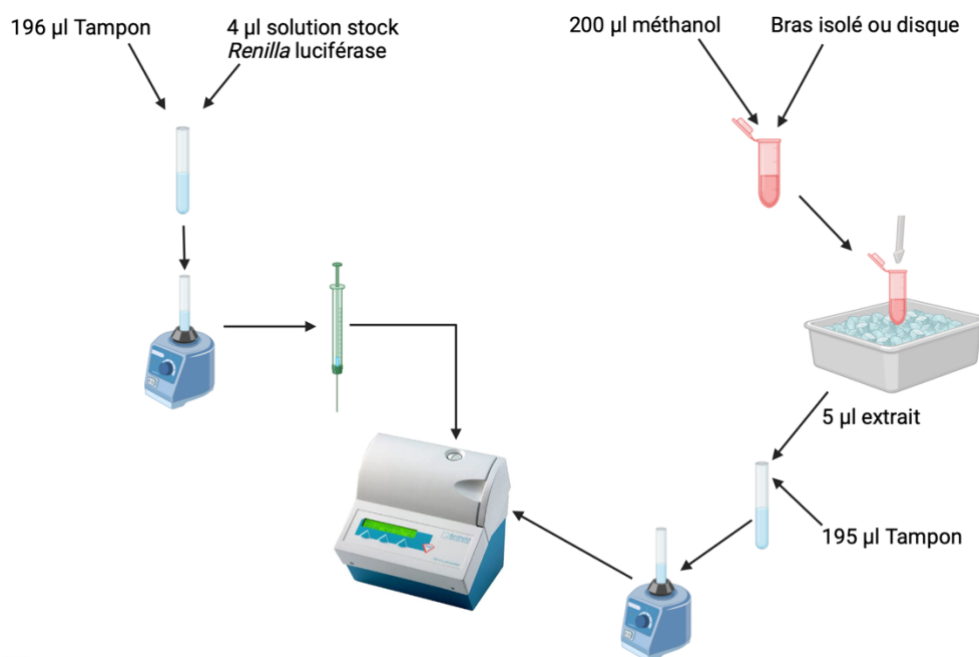


Figure 17 : Schématisation des étapes pour le dosage de coelentérazine (illustration originale)

Cette méthode de dosage a également été employée pour de quantifier la concentration en coelentérazine dans la nourriture distribuée lors de la phase d'induction.

#### 4.4 Activité luciférasique

Pour quantifier l'activité de la luciférase, le processus commence par la préparation des échantillons. Le bras d'ophiure présélectionné pour l'analyse, après avoir été préalablement congelé pour préserver sa composition, est placé dans un Eppendorf contenant 200  $\mu\text{l}$  de tampon Tris. Ce mélange est ensuite broyé à l'aide d'un micro-pilon jusqu'à obtenir une solution homogène. Cette étape est réalisée tout en maintenant le tube sur glace pour éviter la dégradation de la luciférase et préserver la précision des résultats. Après homogénéisation, 20  $\mu\text{l}$  et 40  $\mu\text{l}$  de cet extrait sont prélevées et respectivement diluées dans 180  $\mu\text{l}$  et 160  $\mu\text{l}$  de tampon Tris, puis vortexées pour assurer une distribution uniforme de l'extrait dans le tampon.

La préparation de la solution de coelentérazine est effectuée en dernier, juste avant l'analyse. Pour cela, 5  $\mu\text{l}$  d'une solution stock de coelentérazine (fournie par Prolume Ltd, USA), diluée à une concentration de 1/200 dans du méthanol froid (avec une densité optique de 1 à 430 nm), sont ajoutés à 195  $\mu\text{l}$  de tampon Tris. Ce mélange est vortexé pour garantir une homogénéité complète. La solution obtenue est ensuite transférée dans une seringue. Ce processus de préparation est répété deux fois afin d'avoir une seringue pour l'analyse de chaque dilution de notre échantillon.

Les tubes contenant les échantillons dilués sont ensuite placés un à un dans la chambre d'analyse du luminomètre. Simultanément, la seringue contenant la solution fraîchement

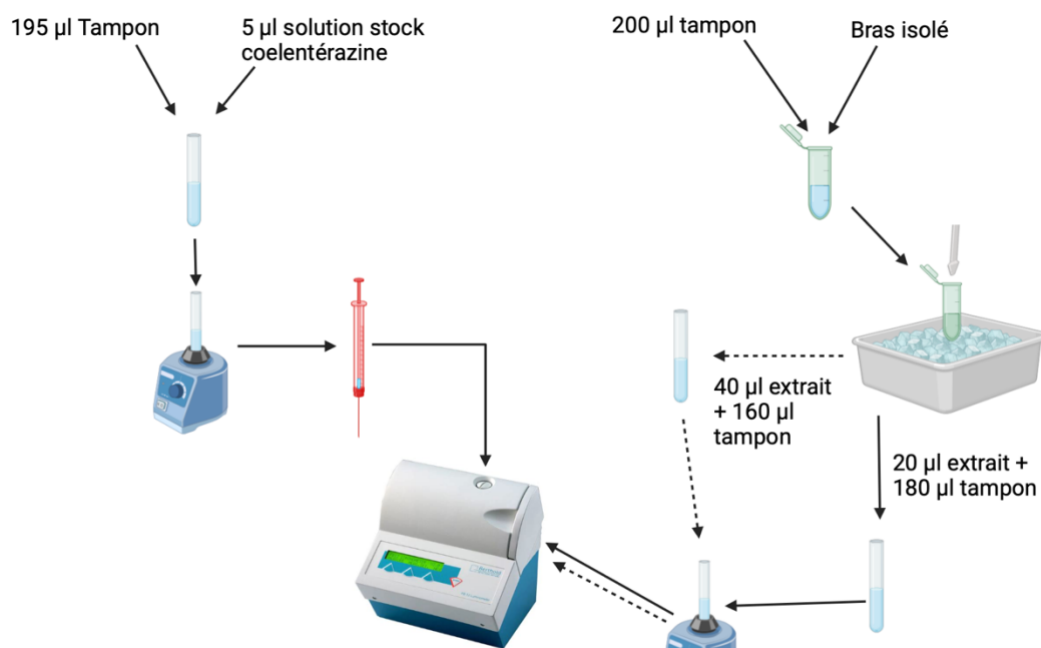


Figure 18 : Schématisation des étapes pour le dosage de l'activité luciférasique (illustration originale)

préparée de coelentérazine est insérée dans la chambre d'injection du luminomètre (Figure 18) (Shimomura, 2012).

Lorsque tous les éléments sont en place, l'enregistrement des données commence. Après une période de 10 secondes dédiée à la mesure du bruit de fond, le contenu de la seringue est injecté dans le tube contenant l'extrait de tissu. L'objectif principal est de mesurer non pas l'émission totale de lumière ( $L_{tot}$ ), mais l'émission maximale de lumière ( $L_{max}$ ), exprimée en unités relatives de lumière par seconde (RLU/s). La moyenne des valeurs de  $L_{max}$  obtenues à partir des deux mesures est ensuite utilisée pour calculer l'activité luciférasique moyenne par gramme de tissu, exprimée en quanta par gramme par seconde (q/g.s) (Annexe 4) (Shimomura, 2012).

#### 4.5 Analyses statistiques

L'ensemble des analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel RStudio (version 2023.03.0, Posit Software, USA). Ce logiciel a été utilisé pour comparer les capacités lumineuses des organismes étudiés aux différents moments prédéfinis.

Avant d'effectuer les analyses statistiques, des vérifications préliminaires ont été effectuées afin de s'assurer du respect des conditions d'application pour la réalisation de tests paramétriques. La normalité des distributions a été évaluée à l'aide du test de Shapiro-Wilk, et l'homogénéité des variances avec le test de Levene. Une p-valeur inférieure à 0,05 indique l'invalidité de ces tests.

Dans le cas où les données respectent les conditions d'application des tests paramétriques peuvent être utilisés. Pour comparer les moyennes de plusieurs groupes, une analyse de variance (ANOVA) est réalisée. Lorsque cette analyse se révèle être significative, elle est suivie du test post-hoc de Dunnett pour localiser les différences significatives entre les groupes. On considère qu'un test est significatif lorsque la p-valeur est inférieure à 0,05.

Lorsque les conditions d'application ne sont pas respectées, et ce malgré une transformation des données en logarithme, des tests non paramétriques sont cette fois-ci utilisés. Nous utilisons pour commencer le test de Kruskal-Wallis, un test non paramétrique équivalant au test ANOVA. Lorsqu'un test de Kruskal-Wallis révèle une différence significative, un test de Dunn est utilisé pour effectuer des comparaisons multiples post-hoc, de manière similaire au test de Dunnett.

Les résultats de nos mesures ont également été représentés graphiquement par l'intermédiaire de la moyenne et de l'erreur standard de la moyenne. Ces représentations graphiques permettent

une interprétation plus aisée des résultats en mettant en évidence les tendances et les différences observées entre les groupes.

## 5 Visualisation histologique

### 5.1 Visualisation de la coelentérazine par autofluorescence

La coelentérazine stock, diluée à une concentration de 1/200 (précédemment utilisée pour mesurer l'activité luciférasique), présente une autofluorescence caractéristique avec une émission de lumière verte ( $\lambda_{\text{excitation}} = 484 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}} = 538 \text{ nm}$ ). Pour détecter et localiser la coelentérazine dans les tissus des échantillons, une analyse par autofluorescence peut donc être effectuée.

Les échantillons sont préparés en les montant entre deux lames de verre dans une solution de glycérol. Cette préparation est ensuite examinée à l'aide d'un microscope confocal (modèle Stellaris 8 Falcon, Leica, Allemagne). Pour chaque bras d'ophiure analysé, des images sont capturées à différentes zones spécifiques : le bras dans son ensemble, les piquants et l'extrémité distale du bras. Ces clichés permettent d'obtenir une vue détaillée de la répartition de la coelentérazine au sein des tissus, facilitant ainsi l'évaluation de sa présence et de sa localisation précise.

### 5.2 Visualisation de la luciférase par immunofluorescence

Dans le cadre de ce mémoire, un immunomarquage de type immuno-histo-fluorescence est réalisé pour mettre en évidence la présence de la luciférase au sein des tissus de l'ophiure. Cette technique permet de localiser spécifiquement l'antigène d'intérêt, la luciférase, au moyen d'une approche indirecte. Le protocole d'immunomarquage indirect commence par l'incubation des échantillons avec un anticorps primaire (AC I) qui se lie directement à l'antigène cible, ici la luciférase. Cet anticorps primaire est spécifique à la luciférase et permet sa visualisation au sein des tissus de l'ophiure. Après cette première incubation, les échantillons sont ensuite traités

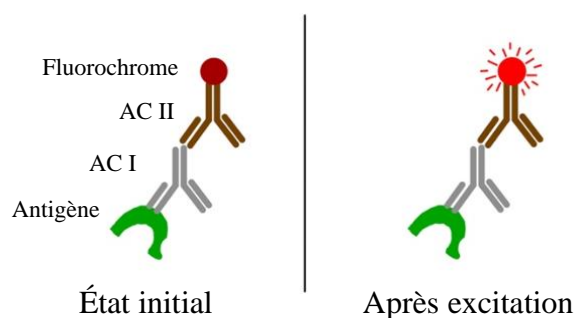


Figure 19 : Représentation schématique de l'immunomarquage indirect. A droite l'état initial avec le fluorochrome non excité. A gauche après excitation du fluorochrome (illustration originale)

avec un anticorps secondaire (AC II). Cet anticorps secondaire est conjugué à un fluorochrome. Lorsqu'il est excitée par une lumière d'une longueur d'onde appropriée, le fluorochrome émet de la lumière, permettant ainsi la visualisation et la localisation de l'anticorps secondaire, et par conséquent de la luciférase, dans les tissus (Figure 19).

Le protocole d'immunomarquage se déroule sur une période de trois jours. Ce délai est nécessaire pour permettre une incubation adéquate avec chaque anticorps, ainsi que pour effectuer les étapes de lavage et de fixation afin de garantir une détection précise et fiable de la luciférase.

Pour assurer la spécificité et la fiabilité des résultats obtenus, des contrôles ont été réalisés. Un premier contrôle a consisté à traiter les échantillons uniquement avec l'anticorps primaire, sans ajout d'anticorps secondaire. Ce contrôle permet de vérifier la présence de signaux non spécifiques ou de fond émis par l'anticorps primaire seul. Un deuxième contrôle a été effectué en utilisant seulement l'anticorps secondaire. Ce contrôle vise à confirmer l'absence de signaux de fluorescence non spécifiques, assurant ainsi que toute fluorescence observée dans les échantillons soit réellement due au couplage spécifique de l'anticorps secondaire avec l'anticorps primaire. Ces contrôles sont essentiels pour valider la spécificité de l'immunomarquage et éliminer les éventuelles sources d'erreur dans l'interprétation des résultats.

### 5.2.1 Préparation de l'échantillon

#### Jour 1 : couplage avec l'anticorps primaire

Pour commencer le processus d'immunomarquage, l'échantillon est soumis à trois bains de rinçage successifs, d'une durée de 10 minutes chacun, dans une solution de PBS à température ambiante. Ces bains permettent d'éliminer les résidus de paraformaldéhyde (PFA) présents dans les tissus, assurant ainsi que les étapes suivantes se déroulent dans des conditions optimales et sans interférence.

L'étape suivante consiste à placer l'échantillon dans une solution de blocage composée de PBS, de 2% de Triton X-100 et de 6% de BSA (bovine serum albumin, en français de l'albumine sérique bovine). Cette incubation, qui dure deux heures à une température réfrigérée (environ 4°C), permet de bloquer les sites de fixation aspécifiques. La présence de Triton X-100 dans la solution permet de perméabiliser les membranes cellulaires, facilitant ainsi la pénétration des anticorps. La BSA empêche la liaison non spécifique des anticorps, garantissant que les anticorps utilisés par la suite se fixent uniquement aux molécules d'intérêt.

Après le blocage, l'échantillon est transféré dans un Eppendorf contenant une solution d'anticorps anti-luciférase (anticorps de lapin, GTX125851, Genetex) dilués au ratio de 1:500 dans du PBS additionné de 1% de Triton X-100 et de 6% de BSA. Cette étape se déroule également au réfrigérateur pour une durée prolongée, idéalement jusqu'au lendemain. Une incubation plus longue améliore la spécificité et l'efficacité de la liaison entre les anticorps et leur antigène cible.

#### Jour 2 : couplage avec l'anticorps secondaire

Après l'incubation avec l'anticorps primaire, l'échantillon est soumis à une série de six bains de rinçage, chacun durant 30 minutes, dans une solution de PBS contenant 1% de Triton X-100. Ces rinçages permettent d'éliminer les anticorps primaires non spécifiquement liés, réduisant ainsi les risques de bruit de fond et garantissant que seule l'interaction spécifique avec l'antigène d'intérêt est conservée.

L'étape suivante consiste à incubé l'échantillon dans un Eppendorf contenant une solution d'anticorps secondaire (Alexafluor 594 anti-lapin : A11037, Thermofisher Invitrogen), dilué à un ratio de 1:500 dans une solution de PBS avec 1% de Triton X-100 et 6% de BSA. L'anticorps secondaire, couplé à un fluorochrome, est utilisé pour détecter l'anticorps primaire qui a précédemment marqué l'antigène d'intérêt. Cette incubation se fait à une température réfrigérée (environ 4°C) et se poursuit jusqu'au lendemain pour permettre une liaison optimale entre l'anticorps secondaire et l'anticorps primaire. Il est crucial que cette étape d'incubation soit réalisée dans l'obscurité totale afin de protéger le fluorochrome de la lumière, qui pourrait altérer la fluorescence et compromettre la qualité des résultats. Les tubes contenant les échantillons doivent être soigneusement isolés de la lumière pour éviter toute dégradation du fluorochrome pendant la période d'incubation.

#### Jour 3 : montage

Pour commencer, après l'incubation avec l'anticorps secondaire, l'échantillon est soumis à six bains de rinçage, chacun durant 30 minutes, dans une solution de PBS contenant 1% de Triton X-100. Ces rinçages permettent d'éliminer tout excès d'anticorps secondaire non lié, réduisant ainsi le bruit de fond et garantissant la spécificité de la détection. Une fois le processus de rinçage terminé, l'échantillon est monté entre deux lames de microscope à l'aide d'un milieu de montage, le Mowiol. L'échantillon est désormais prêt pour l'analyse.

Il est crucial que toutes ces étapes, y compris le montage, soient réalisées à l'abri de la lumière. Cette précaution est essentielle pour maintenir l'intégrité du fluorochrome et garantir des résultats précis et fiables lors de l'observation au microscope.

### 5.2.2 Visualisation

Comme mentionné précédemment, la détection de la luciférase dans les tissus de l'ophiure est réalisée en utilisant un fluorochrome couplé à l'anticorps secondaire. Pour cette analyse, le microscope confocal est employé pour exciter le fluorochrome avec un faisceau lumineux à une longueur d'onde de 590 nm. Lorsque le fluorochrome est excité, il émet une fluorescence à une longueur d'onde de 618 nm, se traduisant par une couleur rouge visible. Cette fluorescence rouge permet de localiser précisément la luciférase au sein des tissus de l'ophiure.

Afin d'obtenir une vue complète et détaillée de la répartition de la luciférase, trois types d'images sont acquises : une vue d'ensemble de l'échantillon, une image des piquants et une image de l'extrémité distale du bras. L'image globale fournit une vue étendue de l'échantillon, permettant de visualiser la distribution générale de la luciférase. L'image des piquants se concentre sur la présence de l'enzyme dans ces structures spécifiques, tandis que l'image de l'extrémité distale du bras examine les parties terminales du bras de l'ophiure, offrant des détails sur la concentration et la localisation précise de la luciférase à ces endroits particuliers.

# Résultats

## 1 Émission totale de lumière : dépolarisation au KCl

L'analyse de l'émission totale de lumière ( $L_{tot}$ ) après dépolarisation au KCl a été réalisée, mais les conditions d'application des tests paramétriques n'étaient pas remplies, même après transformation logarithmique des données. Par conséquent, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été appliqué pour évaluer les différences entre les groupes. Les résultats ont montré une p-valeur de  $2,408 \times 10^5$ , indiquant une différence significative entre les groupes. Pour identifier les groupes spécifiques présentant des différences significatives par rapport au groupe témoin (H0), un test de Wilcoxon a été utilisé. Ce test a révélé que les différences étaient significatives avec le groupe témoin à partir de 69 heures post-induction (H69) (Figure 20). Pour la population contrôle *A. chiajei*, aucune émission lumineuse n'a été détectée (Annexe 5).

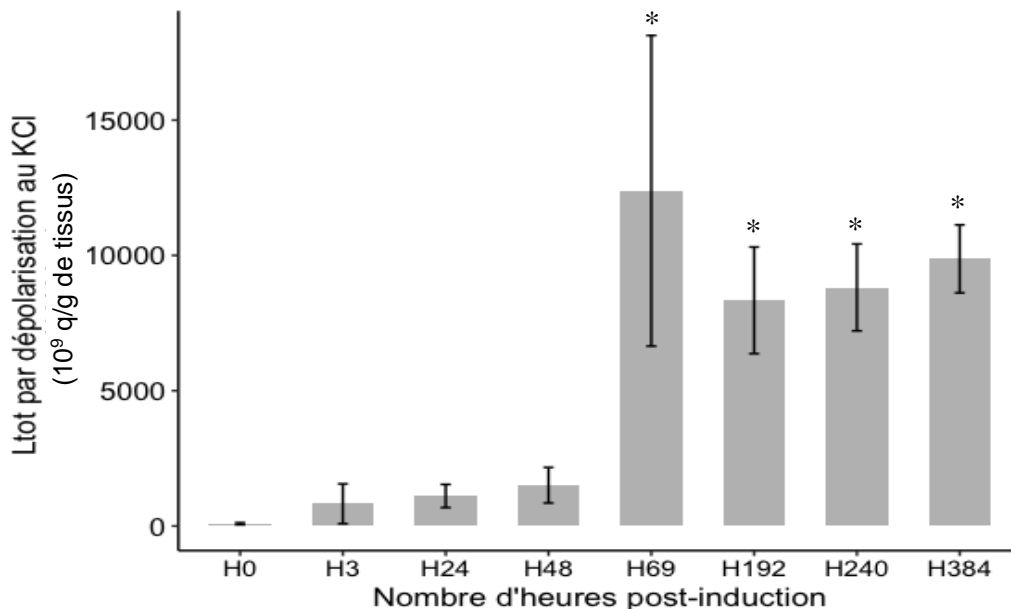


Figure 20 : Graphe de l'émission totale de lumière moyenne par gramme de tissu et de l'erreur standard à la moyenne en fonction du temps chez *A. filiformis*. Les groupes significativement différents du témoin (H0) sont indiqués par le signe « \* ».

## 2 Concentration en coelentérazine

Les résultats des analyses statistiques sur la concentration en coelentérazine dans les bras des organismes ont montré des variations significatives selon les groupes temporels. Après transformation logarithmique des données pour satisfaire les conditions d'application des tests paramétriques, une analyse de variance (ANOVA) a été effectuée. Les résultats ont révélé une p-valeur de  $4,83 \times 10^{-6}$ , indiquant des différences significatives entre les groupes avec un très haut niveau de confiance. Cette p-valeur extrêmement faible confirme l'existence de variations

notables dans les concentrations de coelentérazine en fonction du temps. Pour identifier précisément les groupes présentant des différences significatives, un test post-hoc de Dunnett a été réalisé. Ce test, qui compare chaque groupe de traitement à un groupe témoin, a mis en évidence que les différences étaient statistiquement significatives ( $p$ -valeur  $< 0,05$ ) par rapport au groupe témoin (H0) à partir de 48 heures (H48) (Figure 21). Pour la population contrôle *A. chiajei*, aucune concentration de coelentérazine n'a été détectée dans le bras des échantillons (Annexe 5).

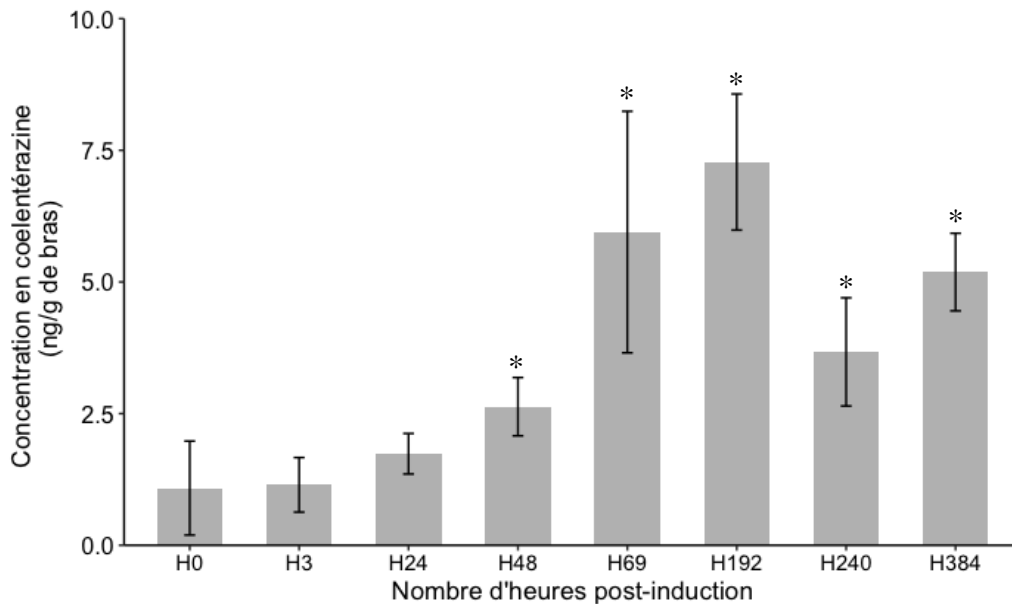


Figure 21 : Graphe de la concentration moyenne en coelentérazine dans les tissus du bras et de l'erreur standard à la moyenne en fonction du temps chez *A. filiformis*. Les groupes significativement différents du témoin (H0) sont indiqués par le signe « \* ».

Les mesures de la concentration de coelentérazine dans les disques des échantillons ont également montré des résultats significatifs. Après transformation logarithmique des données, l'analyse de variance (ANOVA) a révélé des différences significatives entre les groupes, avec une  $p$ -valeur de  $2,593 \times 10^9$ . Pour affiner ces résultats, le test de Dunnett a été utilisé et a démontré que chaque groupe était significativement distinct du groupe témoin (H0) (Figure 22).

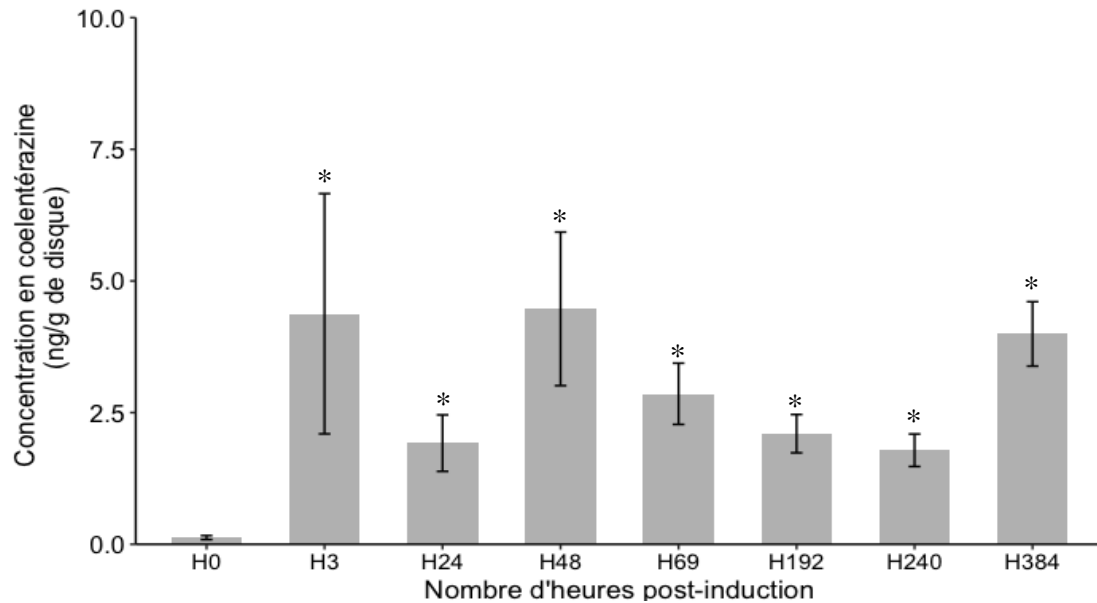


Figure 22 : Graphe de la concentration moyenne en coelentérazine dans les tissus du disque et de l'erreur standard à la moyenne en fonction du temps chez *A. filiformis*. Les groupes significativement différents du témoin (H0) sont indiqués par le signe « \* ».

### 3 Activité luciférasique

L'analyse de l'activité de la luciférase a été réalisée en utilisant des données transformées logarithmiquement, conformément aux conditions préalables d'application des tests. L'ANOVA a été effectuée pour évaluer les différences entre les groupes, mais les résultats ont montré une p-valeur de 0,1244. Cette p-valeur indique qu'il n'y a pas de différence significative dans l'activité de la luciférase entre les différents groupes (Figure 23). Pour la population contrôle *A. chiajei*, aucune activité luciférasique n'a été observée dans les échantillons (Annexe 5).

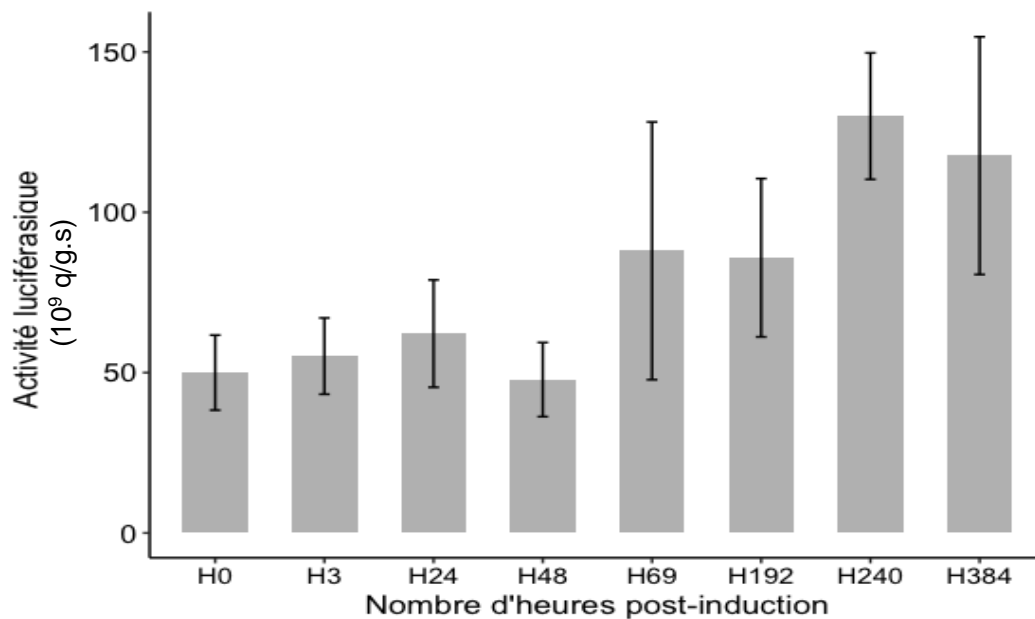


Figure 23 : Graphe de l'activité luciférasique moyenne dans les tissus du bras de l'erreur standard à la moyenne en fonction du temps chez *A. filiformis*.

## 4 Autofluorescence de la coelentérazine

Avant la phase d'induction, les analyses ont révélé l'absence totale de coelentérazine dans les tissus de l'ophiure, comme en témoigne l'absence d'autofluorescence. Cette absence confirme que les tissus ne contiennent pas de coelentérazine endogène avant l'introduction du traitement. Cependant, une fois la phase d'induction commencée, une réapparition progressive de la coelentérazine a été observée et cela 24 heures après l'apport unique de coelentérazine. Cette augmentation dans les tissus se manifeste par une apparition progressive de l'autofluorescence verte au fil du temps, indiquant un retour croissant du substrat dans les tissus de l'ophiure (Figure 24 C et D).

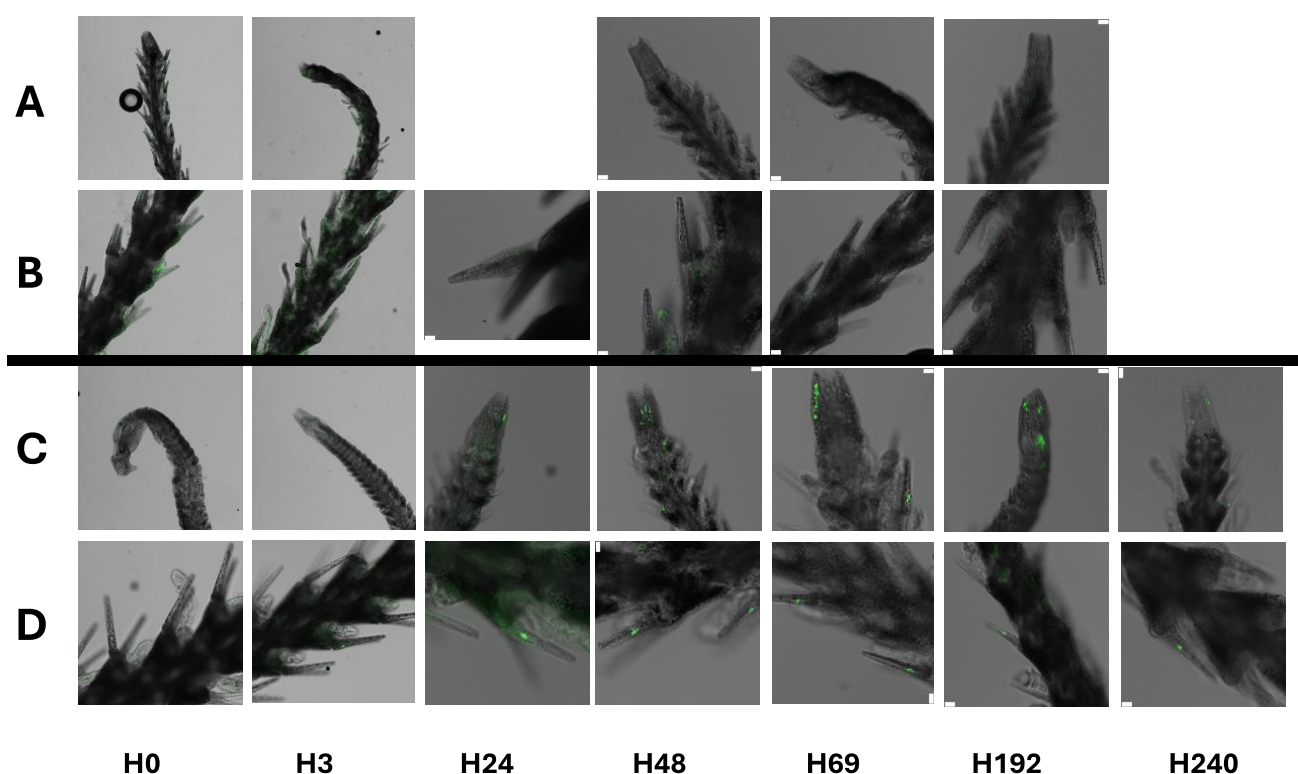


Figure 24 : Images provenant de la visualisation de la coelentérazine dans les tissus par autofluorescence. A) extrémité distale chez *A. chiajei* ; B) piquants de *A. chiajei* ; C) extrémité distale de *A. filiformis* et D) piquants de *A. filiformis*

Pour chaque groupe étudié, des contrôles avec *A. chiajei* ont également été analysés. Il a été constaté que ces échantillons ne présentent aucune autofluorescence à aucun moment de la période d'analyse (Figure 24 A et B). Cette absence d'autofluorescence dans les tissus de *A. chiajei* confirme l'absence de coelentérazine endogène dans cette espèce tout au long de l'expérience.

## 5 Immunomarquage de la luciférase

Lors de l'analyse des échantillons par immunomarquage pour détecter la luciférase, les résultats montrent que chez *A. filiformis*, l'expression de cette enzyme reste stable au fil du temps, tant avant qu'après l'induction (Figure 25A et B). Cette stabilité indique que la présence de luciférase est constante indépendamment des traitements appliqués. En revanche, les contrôles réalisés avec *A. chiajei* ne montrent aucun marquage, confirmant l'absence de luciférase dans les tissus de cette espèce.

Pour garantir la fiabilité des résultats, deux types de contrôles ont été effectués. Le contrôle de l'anticorps primaire a permis de vérifier l'absence de signal non spécifique, tandis que le contrôle de l'anticorps secondaire a confirmé l'absence de fixation aspécifique. Ces contrôles assurent que les signaux observés sont bien dus à la luciférase et non à une fixation aspécifique des anticorps. (Figure 25 C)

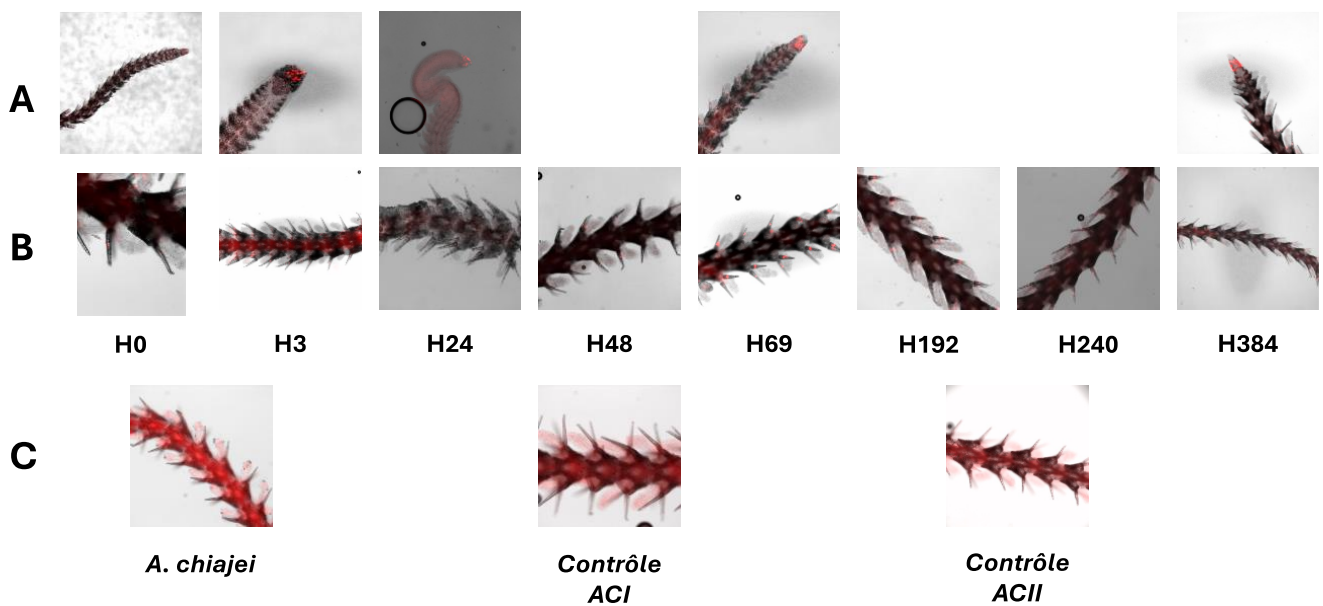


Figure 25 : Images provenant de la visualisation de la luciférase dans les tissus de l'ophiures par immunomarquage. A) tips de *A. filiformis* ; B) piquants de *A. filiformis* ; C) échantillons contrôles

# Discussion

La coelentérazine est la luciférine la plus répandue dans le milieu marin et est utilisée dans les réactions de bioluminescence dans 9 embranchements, dont celui des échinodermes (Haddock et al, 2010 ; Lau & Oakley, 2020). Pour autant, peu d'organismes sont en mesure de la synthétiser (Lau & Oakley, 2020). Cette information a mis sur le tapis l'hypothèse de l'acquisition trophique de la coelentérazine. Cette hypothèse est également appuyée par la présence de la molécule de coelentérazine dans les tissus d'organismes non lumineux (Shimomura, 1987). La bioluminescence chez *A. filiformis* est due à un système coelentérazine-luciférase (Shimomura, 2006). Cette espèce ne faisant pas partie de celle répertoriée comme capable de synthétiser la coelentérazine, l'acquisition trophique du substrat de sa réaction de bioluminescence est étudiée. De ce fait, il a pu être mis en évidence que lorsque l'animal est maintenu en captivité et privé de coelentérazine exogène, il y a une diminution des capacités lumineuses, avec une diminution de la concentration en coelentérazine ainsi qu'une diminution de l'émission totale de lumière par dépolarisation au KCl. Néanmoins l'activité de la luciférase reste stable (Mallefet et al., 2020). Lors de ce mémoire, nous avons mis l'accent sur la ré-acquisition des capacités lumineuses de l'organisme d'intérêt suite à une longue période (*i.e.* 22 jours) de privation de coelentérazine.

## 1 Récupération rapide de coelentérazine dans les tissus

L'analyse de la concentration en coelentérazine dans le disque a révélé une augmentation significative de celle-ci seulement trois heures après l'apport de coelentérazine exogène. Ce résultat confirme la présence de la molécule dans l'estomac de l'animal et indique une absorption rapide du substrat. En revanche, la concentration en coelentérazine dans les tissus du bras ne montre une augmentation significative qu'après 48 heures, comme l'indiquent les mesures luminométriques.

La coelentérazine de synthèse utilisée dans le cadre des analyses, présente une autofluorescence verte ( $\lambda_{\text{excitation}} = 484 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}} = 538 \text{ nm}$ ). Lorsque nos échantillons de tissus sont soumis aux mêmes conditions expérimentales, on observe une apparition progressive de points verts. Ces points d'autofluorescence sont la coelentérazine présente dans les tissus du bras en réaction à la phase d'induction. On peut alors constater l'apparition de cette autofluorescence 24h après celle-ci.

Le couplage des résultats obtenus pour ces trois premières analyses permettent de montrer que la récupération des capacité lumineuse est efficace et ce même avec un unique apport exogène. Ce type de constatation avait également pu être mis en évidence chez d'autres organismes dont la luciférine est d'origine exogène, dont *P. notatus* (Barnes et al., 1973)

## 2 Confirmation de l'hypothèse d'acquisition trophique

Lorsque l'on réalise une analyse couplée de la concentration en coelentérazine dans le disque et de la concentration en coelentérazine dans les tissus du bras, on remarque une augmentation significative dans le disque à partir de seulement 3 heures et une augmentation significative dans le bras après 48h. il y a donc un décalage temporel entre l'absorption de la coelentérazine dans les disques et sa détection dans les tissus du bras.

Ce constat renforce l'hypothèse de l'acquisition trophique de la coelentérazine, comme suggéré par Mallefet et al. (2020). Cette hypothèse propose que la coelentérazine est d'abord absorbée dans le disque avant de migrer vers les bras, où elle est ensuite utilisée pour la bioluminescence.

## 3 Différence entre disponibilité du substrat et récupération fonctionnelle des capacités lumineuses

La récupération des capacités lumineuses après la phase d'induction a été confirmée par une augmentation significative de l'émission totale de lumière par dépolarisation au KCl. Lors d'une dépolarisation au KCl l'organisme produit une série de flash lumineux, ce qui suggère un contrôle nerveux de la bioluminescence (Dewael & Mallefet, 2002). L'hypothèse du contrôle nerveux est soutenue par une étude antérieure montrant que l'émission de lumière peut être induite par la stimulation à l'acétylcholine, un neuromédiateur (Mallefet, 2009).

L'écart temporel observé entre l'augmentation de la coelentérazine dans les tissus du bras et l'augmentation de l'émission totale de lumière met en évidence la différence entre la disponibilité du substrat et la récupération fonctionnelle des capacités lumineuses. En effet, pour produire de la lumière de manière effective, le substrat doit être localisé non seulement dans le bras, mais également dans la zone de stockage appropriée, les photocytes

## 4 Colocalisation de la coelentérazine et de la luciférase.

L'immunodétection de la luciférase, associée à l'autofluorescence de la coelentérazine, a permis de démontrer une colocalisation de l'enzyme et de son substrat. Cette colocalisation a été

observée à la base du piquant ainsi qu'à l'extrémité distale du bras, ces zones étant reconnues comme les sites d'émission de lumière pour l'organisme étudié. La présence concomitante de coelentérazine et de luciférase à la base du piquant est en accord avec l'observation des phototypes, cellules responsables de la réaction lumineuse, localisées à cette région du piquant (Delroisse et al., 2017a).

## 5 Expression stable de luciférase endogène

L'analyse de l'activité de la luciférase n'a pas révélé de différences significatives entre les différents groupes, ce qui est corroboré par les résultats de l'immunomarquage. Ces deux analyses ont montré une expression constante de l'enzyme, qu'elle soit en présence ou en absence de son substrat. Ces observations confirment une précédente étude mettant en évidence cette stabilité dans l'expression de l'enzyme (Mallefet et al., 2020).

Ces résultats appuient le fait que la bioluminescence chez *A. filiformis* est due à un apport exogène, mais uniquement de la coelentérazine. La luciférase est quant à elle propre à l'animal et exprimée de manière stable. En revanche, il existe d'autres organismes où l'acquisition trophique concerne à la fois la coelentérazine et la luciférase. Cette double acquisition a notamment été observée chez le poisson lumineux *Parapriacanthus ransonneti* (Bessho-Uehara et al., 2020).

## 6 Analyse critique et perspective d'amélioration

### 6.1 Analyses luminométriques

En ce qui concerne les analyses luminométriques dans leurs globalités, nous avons observé une variation non continue des valeurs, avec des fluctuations pouvant entraîner une diminution des mesures d'un jour à l'autre. Cette instabilité peut être attribuée à plusieurs facteurs. D'une part, la variabilité biologique entre les individus joue un rôle significatif. Les différences naturelles telles que les variations dans le métabolisme et la réponse physiologique des animaux peuvent entraîner des fluctuations dans les résultats obtenus. Pour atténuer ses fluctuations et limiter l'impact de la variabilité biologique, il pourrait être intéressant de mener cette études avec un nombres plus important d'individus par groupe. En augmentant les effectifs, on pourra non seulement obtenir une moyenne plus représentative mais aussi réduire l'erreur standard à la moyenne, ce qui permettant d'augmenter la précision de nos analyses et donc offrir des conclusions plus robustes et plus fiables.

Un autre facteur potentiel de fluctuation est l'état de régénération des bras des ophiures. Étant donné que ces animaux possèdent des capacités de régénération de leurs membres, il est possible que les capacités lumineuses des bras ne soit pas pleinement opérationnelle en cas de lésions. ce qui pourrait influencer les résultats. Afin d'obtenir des résultats robustes, le idéal serait de travailler avec des bras complètement intacts ou entièrement régénérés. Cependant, en raison de la capacité d'autotomie de notre ophiure, environ 80 % des bras montrant des signes de régénération (Rosenberg & Lundberg, 2004, Dupont & Thorndyke, 2006). Cette réalité biologique rend difficile l'obtention de conditions optimales pour les expériences, limitant ainsi la possibilité de travailler dans un contexte totalement contrôlé.

La variation dans la quantité de coelentérazine ingérée pendant la phase d'induction pourrait également expliquer les fluctuations observées. Les ophiures de l'espèce *A. filiformis* étant principalement des organismes suspensivores (Rosenberg & Lundberg, 2004), il est difficile de déterminer avec précision leur taux d'alimentation (Loo et al., 1996). Cette particularité rend incertaine l'uniformité de la consommation de l'aliment enrichi en coelentérazine par chaque individu. Puisque la coelentérazine est acquise par voie alimentaire, les concentrations de cette molécule peuvent varier d'un individu à l'autre et donc entraîner des disparités dans les capacités lumineuses observées. Connaître les quantités exactes de coelentérazine ingérées permettrait de standardiser les valeurs luminométriques en fonction de la quantité ingérée, offrant ainsi une meilleure compréhension de la récupération des capacités lumineuses de l'organisme. Malheureusement, aucune technique n'a encore été développée pour injecter un volume alimentaire prédéfini directement dans la cavité stomacale des ophiures, ce qui complique l'obtention de résultats uniformes.

## 6.2 Immunodétection

Concernant les immunomarquages réalisés, plusieurs défis ont été rencontrés qui ont pu influencer la qualité des résultats obtenus. Premièrement, il a été constaté que l'intégrité des extrémités distales n'a pas pu être préservée de manière optimale pour tous les échantillons analysés. Les manipulations et les étapes de préparation des échantillons nécessitent une attention particulière afin de maintenir l'intégrité structurelle des bras d'ophiure, ce qui est crucial pour une évaluation précise des données. Une approche plus délicate lors des étapes de traitement et de montage pourrait potentiellement améliorer la qualité des échantillons et la fiabilité des observations.

En outre, certains échantillons ont été conservés dans une solution de PBS après fixation, mais des signes de développement fongique ont été observés, ce qui suggère une défaillance dans la conservation des échantillons. Cette contamination est survenue à la suite d'une panne du réfrigérateur, entraînant une conservation non optimale. Pour éviter de telles situations à l'avenir, il serait judicieux d'ajouter un agent antifongique, tel que le  $\text{NaN}_3$ , au PBS utilisé pour la conservation des échantillons.

## 7 Perspectives futures

Les analyses réalisées au cours de ce mémoire ont permis de confirmer que la coelentérazine est acquise par *Amphiura filiformis* via un mécanisme d'acquisition trophique. Cette conclusion est soutenue par la présence d'un décalage temporel entre la détection de la coelentérazine dans le disque central de l'ophiure et son apparition dans les tissus des bras, où elle participe à la bioluminescence. En revanche, lors des mêmes analyses effectuées sur l'espèce contrôle *Amphiura chiajei*, nous n'avons pas détecté de coelentérazine dans les tissus des bras, bien qu'elle soit présente dans le disque. Cela suggère que la coelentérazine nécessite un processus spécifique pour être absorbée et distribuée dans les tissus, un aspect qui mérite d'être exploré davantage pour comprendre pleinement le phénomène d'acquisition trophique chez *A. filiformis*.

Un autre point crucial mis en lumière par nos recherches est la différence entre la simple présence de coelentérazine dans les tissus et la récupération effective des capacités bioluminescentes de l'ophiure. Nos observations indiquent qu'après avoir été absorbée par l'organisme, la coelentérazine doit se rendre à des endroits spécifiques, les photocytes, situés à la base des piquants et à l'extrémité distale des bras, pour permettre l'émission de lumière. Le mécanisme exact de cette translocation reste inconnu. Toutefois, des travaux complémentaires menés par l'équipe de recherche en biologie marine de l'UCLouvain ont révélé la présence de coelentérazine dans le liquide cœlomique, ce qui suggère que ce fluide pourrait jouer un rôle dans le transport de la molécule au sein de l'organisme. Malgré cette avancée, les mécanismes précis qui permettent la translocation de la coelentérazine vers les photocytes restent à élucider.

# Conclusion

Le premier objectif de ce mémoire était de caractériser la récupération des capacités lumineuses chez *Amphiura filiformis* après une captivité de 22 mois, durant laquelle la coelentérazine, le substrat clé de la réaction de bioluminescence, était absente de leur alimentation. Cette investigation visait également à soutenir l'hypothèse de l'acquisition trophique de la coelentérazine. Nos analyses ont révélé qu'un apport unique de coelentérazine exogène a permis une redistribution de la molécule dans l'organisme et une récupération progressive des capacités à émettre de la lumière. L'analyse détaillée de cette récupération et l'observation des décalages temporels entre la présence de la coelentérazine dans le disque, la présence de coelentérazine dans les bras, et la restauration de la bioluminescence naturelle via une dépolarisation au KCl, ont permis de caractériser ce processus en trois étapes principales : ingestion de la coelentérazine, absorption de la molécule depuis le disque vers les tissus des bras, et récupération effective des capacités lumineuses.

Le deuxième objectif de ce travail était de visualiser la coelentérazine et la luciférase au sein des tissus de l'animal, afin d'établir une éventuelle colocalisation de ces deux éléments. L'immunodétection de la luciférase a révélé que cette enzyme est localisée à la base des piquants et à l'extrémité distale des bras. Cette analyse a également confirmé que la luciférase est exprimée de manière stable, indépendamment de la présence ou de l'absence de son substrat. Par ailleurs, la visualisation de la coelentérazine via son autofluorescence a montré que cette molécule se localise aux mêmes endroits. Ces deux analyses ont donc permis de confirmer la colocalisation de la coelentérazine et de la luciférase, en accord avec la localisation des photocytes responsables de l'émission lumineuse.

En somme, ce mémoire a apporté des preuves supplémentaires de l'acquisition trophique de la coelentérazine chez *Amphiura filiformis* et a permis de mieux comprendre les mécanismes de bioluminescence, en particulier la relation étroite entre la coelentérazine et la luciférase au sein des tissus de l'animal

Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives de recherche pour approfondir notre compréhension du mécanisme d'acquisition trophique et du transport intracellulaire de la coelentérazine. L'investigation des processus spécifiques d'absorption et de distribution de cette molécule, ainsi que des mécanismes de translocation vers les sites d'émission lumineuse, constituera des étapes clés pour maîtriser ce domaine encore peu exploré. Ces recherches futures permettront non seulement de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la

bioluminescence chez *A. filiformis*, mais également d'apporter des connaissances fondamentales qui pourraient être appliquées à d'autres organismes bioluminescents.

# Bibliographie

- Ailioaie, L. M., & Litscher, G. (2020). Molecular and cellular mechanisms of arthritis in children and adults: New perspectives on Applied Photobiomodulation. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18), 6565. <https://doi.org/10.3390/ijms21186565>
- Barnes, A., Case, J., & Tsuji, F. (1973). Induction of bioluminescence in a luciferin deficient form of the marine teleost, *Porichthys*, in response to exogenous luciferin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part a Physiology*, *46*(4), 709–723. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(73\)90123-0](https://doi.org/10.1016/0300-9629(73)90123-0)
- Claes, J., Nilsson, DE., Straube, N. *et al.* (2014). Iso-luminance counterillumination drove bioluminescent shark radiation. *Sci Rep* **4**, 4328. <https://doi.org/10.1038/srep04328>
- Clause, A., & Capaldi, E. A. (2006). Caudal autotomy and regeneration in lizards. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, *305A* (12), 965-973. <https://doi.org/10.1002/jez.a.346>
- 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.jcz.2017.05.001>
- 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., Ortega-Martinez, O. *et al.* (2014) High opsin diversity in a non-visual infaunal brittle star. *BMC Genomics* **15**, 1035. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1035>
- Desjardin, D.E., Oliveira, A.G. & Stevani, C.V. Fungi bioluminescence revisited. *Photochem Photobiol Sci***7**, 170–182 (2008). <https://doi.org/10.1039/b713328f>
- Dewael, Y., & Mallefet, J. (2002). Luminescence in ophiuroids (Echinodermata) does not share a common nervous control in all species. *The Journal of experimental biology*, *205*(Pt 6), 799–806. <https://doi.org/10.1242/jeb.205.6.799>

- Dewael, Y., & Mallefet, J. (2002). Luminescence in ophiuroids (Echinodermata) does not share a common nervous control in all species. *The Journal of Experimental Biology*, 205(6), 799–806. <https://doi.org/10.1242/jeb.205.6.799>
- Duchatelet, L., Sugihara, T., Delroisse, J., Koyanagi, M., Rezsöházy, R., Terakita, A., & Mallefet, J. (2020). From extraocular photoreception to pigment movement regulation: a new control mechanism of the lanternshark luminescence. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67287-w>
- Dupont, S., & Thorndyke, M. C. (2006). Growth or differentiation? Adaptive regeneration in the brittlestar *Amphiura filiformis*. *The Journal of experimental biology*, 209(Pt 19), 3873–3881. <https://doi.org/10.1242/jeb.02445>
- Fleiss, A., & Sarkisyan, K. S. (2019). A Brief Review of Bioluminescent Systems (2019). *Current Genetics*, 65(4), 877-882. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00951-5>
- Frank, T. M., Widder, E. A., Latz, M. I., & Case, J. F. (1984). Dietary maintenance of bioluminescence in a deep-sea mysid. *Journal of experimental biology*, 109(1), 385-389. <https://doi.org/10.1242/jeb.109.1.385>
- 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. H., Rivers, T. J., & Robison, B. H. (2001). Can coelenterates make coelenterazine? Dietary requirement for luciferin in cnidarian bioluminescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 11148–11151. <https://doi.org/10.1073/pnas.201329798>
- Harvey, E. N. (1952). Bioluminescence
- Hastings, J. W. (2012). Chapter 52 – Bioluminescence in: *Cell Physiology Source Book* (4th ed), Academic press (2012), pp. 925-947 <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-387738-3.00052-4>
- Herring, P. J. (1987). Systematic distribution of bioluminescence in living organisms. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 1(3), 147-163. <https://doi.org/10.1002/bio.1170010303>

- Herring, P. J., & Widder E. A. Widder. (2001). Bioluminescence. In *Encyclopedia of Ocean Sciences (Second Edition)*, édité par John H. Steele, 376-84. Oxford: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012374473-9.00200-9> .
- Hill, J.M. & Wilson, E. (2008). *Amphiura filiformis* A brittlestar. In Tyler-Walters H. and Hiscock K. (eds) *Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Reviews*, [on-line]. Plymouth: Marine Biological Association of the United Kingdom.
- Jones, A. R., & Mallefet, J. (2013). Why do Brittle stars emit light? Behavioural and Evolutionary approaches of bioluminescence. *Cahiers De Biologie Marine*, 54(4), 729-734. <http://www.vliz.be/imisdocs/publications/258086.pdf>
- Kaskova, Z. M., Tsarkova, A. S., & Yampolsky, I. V. (2016). 1001 Lights: Luciferins, Luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. *Chemical Society Reviews*, 45(21), 6048-6077. <https://doi.org/10.1039/c6cs00296j>
- Lau, E. S., & Oakley, T. H. (2020). Multi-level convergence of complex traits and the evolution of bioluminescence. *Biological Reviews*, 96(2), 673-691. <https://doi.org/10.1111/brv.12672>
- Lawrence, J.M. (1987). *A Functional Biology of Echinoderms*.
- 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>
- 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
- Mallefet, J., Duchatelet, L., & Coubris, C. (2020). Bioluminescence induction in the ophiuroid *Amphiura filiformis* (Echinodermata). *The Journal of Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1242/jeb.218719>
- Mallefet, Jérôme; Stevens, Darren W.; Duchatelet, Laurent (2021). Bioluminescence of the Largest Luminous Vertebrate, the Kitefin Shark, *Dalatias licha*: First Insights and Comparative Aspects. *Frontiers. Collection*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.633582>
- Mascarenhas, V., Keck, T. (2018). Marine Optics and Ocean Color Remote Sensing. In: Jungblut, S., Liebich, V., Bode, M. (eds) *YOUMARES 8 – Oceans Across Boundaries: Learning from each other*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-93284-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-93284-2_4)

National Ocean Service (s.d.). How far does light travel in the ocean.

[https://oceanservice.noaa.gov/facts/light\\_travel.html](https://oceanservice.noaa.gov/facts/light_travel.html)

Oba, Y., Kato, S., Ojika, M., & Inouye, S. (2009). Biosynthesis of coelenterazine in the deep-sea copepod, *Metridia pacifica*. *Biochemical and biophysical research communications*, 390(3), 684–688. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.028>

OBIS (s.d.). *Amphiura filiformis* [en ligne, consulté le 1 août 2024] <https://obis.org/taxon/125080>

Renwart, M., & Mallefet, J. (2013). First study of the chemistry of the luminous system in a deep-sea shark, *Etmopterus spinax* linnaeus, 1758 (Chondrichthyes: Etmopteridae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 448, 214-219. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.07.010>

Rosenberg, R., & Lundberg, L. (2003). Photoperiodic activity pattern in the Brittle star *Amphiura filiformis*. *Marine Biology*, 1(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1365-z>

Roy-Barman, M., & Jeandel, C. (2011). *Géochimie Marine Circulation Océanique, Cycle Du Carbone et Changement Climatique* (pp. 362-pages). Vuibert Société géologique de France.

Shimomura, O. (1985). Bioluminescence in the sea: photoprotein systems. In *Symposia of the Society for Experimental Biology* (Vol. 39, pp. 351-372).

Shimomura, O. (1987). Presence of coelenterazine in non-bioluminescent marine organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 86(2), 361–363. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(87\)90306-3](https://doi.org/10.1016/0305-0491(87)90306-3)

Shimomura, O. (2006). *Bioluminescence: chemical principles and methods*. <http://ci.nii.ac.jp/ncid/BA79047271>

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>

Termier, G., Termier, H., Tétry, A., (s.d). « ÉCHINODERMES », *Encyclopædia Universalis* [en ligne, consulté le 26 juillet 2023] <https://www.universalis.fr/encyclopedie/echinodermes/>

Thomson, C., Herring, P., & Campbell, A. (1995). Evidence For De Novo Biosynthesis of Coelenterazine in the Bioluminescent Midwater Shrimp, *Systellaspis Debilis* C. *Journal of*

- the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 75(1), 165-171.  
<https://doi.org/10.1017/S0025315400015277> doi:10.1017/S0025315400015277
- Warner, J. A., & Case, J. F. (1980). The zoogeography and dietary induction of bioluminescence in the midshipman fish, *Porichthys notatus*. *The Biological Bulletin*, 159(1), 231-246. <https://doi.org/10.2307/1541021> .
- Warrant, E. J., & Locket, N. A. (2004). Vision in the deep sea. *Biological Reviews*, 79(3), 671-712. <https://doi.org/10.1017/s1464793103006420>
- 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>
- Williams, G. C., & Van Syoc, R. (2007). Methods of preservation and anesthetization of marine invertebrates. In University of California Press eBooks (pp. 37–42). <https://doi.org/10.1525/9780520930438-010>
- Wilson, T., & Hastings, J. W. (1998). BIOLUMINESCENCE. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14(1), 197-230. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.197>
- Xerces Society (s.d.) Keeping the lights burning: The status of fireflies in the United States and Canada. [en ligne, consulté le 23 juillet 2023] <https://xerces.org/blog/status-of-fireflies-in-the-united-states-and-canada>
- 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). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax4942>
- Biressi, A. C. M., Zou, T., Dupont, S., Dahlberg, C., Di Benedetto, C., Bonasoro, F., Thorndyke, M., & Carnevali, M. D. C. (2009). Wound healing and arm regeneration in *Ophioderma longicaudum* and *Amphiura filiformis* (Ophiuroidea, Echinodermata): comparative morphogenesis and histogenesis. *Zoomorphology*, 129(1), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s00435-009-0095-7>
- Viviani, D. (1805). *Phosphorescencia maris quattuordecim lucescentium animalculorum novis speciebus illustrata* (Genova).
- Herring, P. J. (2007). REVIEW. Sex with the lights on? A review of bioluminescent sexual dimorphism in the sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87(4), 829–842. doi:10.1017/S0025315407056433

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

Coubris, C. & Mallefet, J. (2022). Seasonal variation of luminescence capabilities in *Amphiura filiformis* (Echinodermata-Ophiuroidea). Oral presentation. 21<sup>st</sup> International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence & XIX International Symposium on Luminescence Spectrometry. Gijon, Spain.

Stöhr, S.; O'Hara, T.; Thuy, B. (Eds) (2024). World Ophiuroidea Database. Accessed at <https://www.marinespecies.org/ophiuroidea> on 2024-08-01. doi:10.14284/358

# Annexes

## Annexe 1: Préparation de la nourriture pour l'induction

Pour 48 ophiures, la préparation de la nourriture destinée à l'induction se compose des éléments suivants : 5 g de granules pour poissons d'eau douce, 2 ml d'huile de foie de morue et 2 ml de coelentérazine 1DO. Ce mélange est ensuite mis sous-vide pour assurer une meilleure imprégnation des granules avec la coelentérazine. Il est ensuite placé au congélateur à -80 °C afin de préserver l'intégrité de la coelentérazine. Le jour de l'induction, chaque anneau d'alimentation reçoit un volume déterminé de granules. Par la suite, la concentration en coelentérazine du mélange sera mesurée conformément au protocole standard pour le dosage de la coelentérazine.

## Annexe 2 : Conversion et standardisation des données pour l'émission totale de lumière ( $L_{tot}$ ) par dépolarisation au KCl

Lors de l'utilisation du luminomètre avec le filtre 0,1%, nous avons déterminé que 1 RLU/s = 15 757,14 q/s, c'est ce qu'on appelle le facteur de conversion (Fc). Lorsque le luminomètre effectue son analyse, il enregistre l'émission totale de lumière ( $L_{tot}$ ) en RLU, et pour rappel, l'analyse se fait sur 190 secondes.

Afin de convertir la valeur en quanta par gramme de tissu (q/g), la formule suivante est utilisée :

$$L_{tot} (q/g) = \frac{L_{tot} (RLU) \times temps (s) \times Fc}{masse (g)}$$

## Annexe 3 : Conversion et standardisation des données la concentration en coelentérazine

Lors de l'utilisation du luminomètre avec le filtre 1%, nous avons déterminé que 1 RLU/s = 1696,71 q/s, c'est ce qu'on appelle le facteur de conversion (Fc).

Lorsque le luminomètre effectue son analyse, il enregistre l'émission totale de lumière ( $L_{tot}$ ) en RLU, et pour rappel, l'analyse se fait sur 190 secondes. Nous devons également tenir compte que l'analyse se fait à partir d'une dilution de l'échantillon de départ. Il faut donc préalablement déterminer le facteur de dilution (Fd) :

$$Fd = \frac{volume\ final}{volume\ initial}$$

Afin de convertir la valeur en quanta par gramme de tissu (q/g), la formule suivante est utilisée :

$$L_{tot} (q/g) = \frac{L_{tot} (RLU) \times temps (s) \times Fc \times Fd}{masse (g)}$$

On sait également que 1ng de coelentérazine émet  $2,52 \times 10^{11}$  photons (ou quanta). Donc,  $1q = 3,97 \times 10^{-12}$  ng de coelentérazine. Cette valeur nous permet finalement de déterminer la concentration en coelentérazine, selon la formule suivante :

$$Concentration \text{ en coelentérazine (ng/g de tissu) } = L_{tot} (q/g) \times 3,97 \times 10^{-12}$$

#### Annexe 4 : Conversion et standardisation des données pour l'activité luciférasique

Lors de l'utilisation du luminomètre avec le filtre 1%, nous avons déterminé que  $1 \text{ RLU/s} = 1696,71 \text{ q/s}$ , c'est ce qu'on appelle le facteur de conversion (Fc).

Pour rappel, lors de cette analyse, nous travaillons avec 2 dilutions de notre échantillon. Les facteurs de dilution (Fd) sont déterminés, ainsi que le facteur de dilution moyen ( $F_{c\text{moyen}}$ ). Lorsque le luminomètre effectue son analyse, il enregistre la valeur maximale du pic de lumière ( $L_{\text{max}}$ ) en RLU/s. La moyenne des résultats pour les deux dilutions est ensuite calculée ( $L_{\text{max moyen}}$ ).

L'activité luciférasique moyenne par gramme d'échantillon est ensuite déterminée en utilisant la formule suivante :

$$Activité \text{ luciférasique (q/g.s) } = \frac{L_{\text{max moyen}} (RLU/s) \times Fc \times Fd \text{ moyen}}{masse (g)}$$

#### Annexe 5 : Valeurs luminométriques

Pour l'espèce contrôle, *A. chiajei*

Heures post-induction	Coelentérazine (ng/g)	Luciférase ( $10^9 \text{ q/g.s}$ )	Émission totale ( $10^9 \text{ q/g}$ )	Coelentérazine dans le disque (ng/g)
0	0,08	2	2	0,01
3	0,11	3	6	2,23
24	0,11	1	3	0,23
48	0,09	0	2	0,87
69	0,11	2	1	0,08
192	0,05	0	3	0,06
240	0,04	0	9	0,01
384	0,03	0	3	0,02

Pour l'espèce d'intérêt, *A. filiformis*

Heures post-induction	Echantillon	Coelentérazine (ng/g)	Luciférase (10 <sup>9</sup> q/g.s)	Émission totale (10 <sup>9</sup> q/g)	Coelentérazine dans le disque (ng/g)
0	Afi12606C	0,09	70	251	0,03
0	Afi22606C	0,12	34	7	0,04
0	Afi32606C	0,11	5	3	0,1
0	Afi42606C	5,53	41	73	0,28
0	Afi52606C	0,54	82	143	0,14
0	Afi62606C	0,13	68	41	0,17
3	Afi12706C	0,15	25	4	0,5
3	Afi22706C	0,5	12	4	1,15
3	Afi32706C	0,88	78	186	14,95
3	Afi42706C	3,56	76	4501	2,11
3	Afi52706C	0,34	64	234	1,23
3	Afi62706C	1,45	76	12	6,32
24	Afi12806C	0,48	59	502	1,13
24	Afi22806C	0,91	119	1377	0,43
24	Afi32806C	2,78	36	1207	1,62
24	Afi42806C	2,2	36	2992	1,5
24	Afi52806C	2,62	105	580	4,13
24	Afi62806C	1,43	18	7	2,72
48	Afi12906C	1,7	44	3205	5,02
48	Afi22906C	2,32	98	3543	1,32
48	Afi32906C	3,17	22	1905	11,24
48	Afi42906C	1,04	25	389	1,98
48	Afi52906C	4,95	61	4	3,81
48	Afi62906C	2,61	37	1	3,46

<b>69</b>	Afi13006C	2,54	35	11525	3,3
<b>69</b>	Afi23006C	11,19	43	12703	0,8
<b>69</b>	Afi33006C	1,2	146	1977	4,29
<b>69</b>	Afi43006C	2,27	15	2579	2,04
<b>69</b>	Afi53006C	3,71	25	5927	4,48
<b>69</b>	Afi63006C	14,76	264	39619	2,24
<b>192</b>	Afi10507C	8,61	67	7462	1,98
<b>192</b>	Afi20507C	10,97	205	6145	1,45
<b>192</b>	Afi30507C	8,59	52	14889	1,32
<b>192</b>	Afi40507C	2,21	66	2568	1,46
<b>192</b>	Afi50507C	4,85	39	5494	3,45
<b>192</b>	Afi60507C	8,43	86	13487	2,93
<b>240</b>	Afi10707C	0,87	96	11259	0,7
<b>240</b>	Afi20707C	2,68	110	3799	1,5
<b>240</b>	Afi30707C	6,2	225	12164	2,02
<b>240</b>	Afi40707C	6,56	107	13178	2,75
<b>240</b>	Afi50707C	4,69	107	7445	2,42
<b>240</b>	Afi60707C	1,02	135	5061	1,33
<b>384</b>	Afi11307C	6,34	222	12337	2,31
<b>384</b>	Afi21307C	4,2	82	9619	5,27
<b>384</b>	Afi31307C	2,96	243	12180	2,03
<b>384</b>	Afi41307C	3,92	53	9870	4,9
<b>384</b>	Afi51307C	7,82	73	11199	5,43
<b>384</b>	Afi61307C	5,88	33	4031	4,03