

Catégorie Agronomique

Rue Paul Pastur, 11 – BP 7800 Ath

☎ : +32 (068) 26 46 61 ☎ : +32 (0)68 26 46 62

@ : secr.agro@condorcet.be

www.condorcet.be

Etude neuroanatomique des étoiles de mer *Asterias rubens* et *Asterina gibbosa*

Travail de fin d'études présenté par

Vinciane Meunier

en vue de l'obtention du grade académique

de Bachelier en agronomie

Orientation : Agro-industries et biotechnologies

Promotrice : Mme. Lanterbecq

**Etude neuroanatomique des
étoiles de mer *Asterias rubens* et
*Asterina gibbosa***



Catégorie Agronomique

Rue Paul Pastur, 11 – BP 7800 Ath

☎ : +32 (0)68 26 46 61 ☎ : +32 (0)68 26 46 62

@ : secr.agro@condorcet.be

www.condorcet.be

**Etude neuroanatomique des
étoiles de mer *Asterias rubens* et
*Asterina gibbosa***

Travail de fin d'études présenté par

Vinciane Meunier

en vue de l'obtention du grade académique

de Bachelier en agronomie

Orientation : Agro-industries et biotechnologies

Promotrice : Mme. Lanterbecq

Remerciements

Ce travail de fin d'étude est l'aboutissement de trois années de bachelier, trois années où j'ai pu rencontrer des personnes formidables.

La réalisation de ce travail a été possible grâce au soutien du Dr Jérôme Delroisse, mon maître de stage, ainsi que du Pr. Déborah Lanterbecq ma promotrice.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers eux, ma reconnaissance pour le fait de m'avoir suivie, consacré leur temps, soutenue et consolée durant la réalisation de ce document.

Je tiens aussi à remercier les membres du laboratoire de Biologie des Organismes Marins et Biomimétisme de l'Université de Mons d'avoir supporté mon humour parfois un peu spécial, de m'avoir aidée lors de problèmes auxquels j'ai été confrontée durant ces 4 mois au sein de leur laboratoire.

Merci à Thomas, mes amis ainsi que ma famille, qui m'ont aidé à plusieurs niveaux lors de la rédaction.

Table des matières

1. Introduction	1
2. Partie théorique	3
2.1 Généralité sur les échinodermes	3
2.2 Espèces étudiées	7
2.3 Morphologie externe des espèces étudiées	9
2.4 Morphologie interne des espèces étudiées	11
2.5 Le système nerveux	16
2.5.1 Le système nerveux principal.....	17
2.5.2 Le système nerveux périphérique	19
2.6 Marqueurs neuronaux.....	19
2.6.1 Anticorps anti- α -tubuline acétylée	20
2.6.2 Anticorps anti-sérotonine.....	20
2.6.3 Anticorps « luciférase d'ophiure »	21
3. Matériel et méthode.....	22
3.1 Récolte des spécimens et maintien.....	22
3.2 Observations au binoculaire et anesthésie des étoiles	22
3.3 Dissection	23
3.4 Fixation des tissus	23
3.5 La microscopie électronique à balayage (MEB)	24
3.6 Décalcification des tissus	27
3.7 Enrobage en paraffine et réalisation de coupes histologiques.....	27
3.8 Colorations topographiques au trichrome de Masson	29
3.9 Colorations immunohistochimiques	30
4 Résultats	34
4.1 Morphologie générale des espèces étudiées	34
a. Asterina gibbosa	34
b. Asterias rubens.....	36

4.2	Morphologie fine des espèces étudiées.....	38
4.2.1	Etude morphologique au microscope électronique à balayage	38
a.	<i>Asterina gibbosa</i>	38
4.2.2	Etude histologique et immunohistochimique	41
4.2.2.1	<i>Asterina gibbosa</i>	41
a.	Anticorps anti- α -tubuline acétylée sur <i>Asterina gibbosa</i> : coupes transversales	41
b.	Anticorps anti- α -tubuline acétylée sur <i>Asterina gibbosa</i> : coupes longitudinales.....	46
c.	Anticorps « luciférase d'ophiure » sur <i>Asterina gibbosa</i> : coupes transversales	49
4.2.2.2	<i>Asterias rubens</i>	51
a.	Anticorps anti- α -tubuline acétylée sur <i>Asterias rubens</i> : coupes transversales	51
b.	Anticorps anti-sérotonine sur <i>Asterias rubens</i> : coupes transversales....	53
5.	<i>Discussion</i>	54
5.1	Comparaison de la morphologie externe des deux étoiles de mer modèles	54
5.2	Description et analyse de la morphologie interne des deux étoiles <i>Asterina gibbosa</i> et <i>Asterias rubens</i>.....	54
a.	Système nerveux principal.....	54
b.	Parois du corps.....	55
c.	Système aquifère.....	56
d.	Système digestif	56
e.	Tableau récapitulatif des zones marquées	57
5.3	Application MetaMorphos	58
6.	<i>Conclusion</i>.....	59
a.	Conclusion générale	59
b.	Perspectives	59
7.	<i>Références</i>	61
7.1	Bibliographie	61
7.2	Sitographie.....	64

7.3 Références des figures	64
8. Annexes	67

Table des figures

Figure 1	Arbre phylogénétique des bilatériens.	3
Figure 2	<i>Ophielepis superba</i> .	4
Figure 3	Oursin blin de méditerranée.	4
Figure 4	<i>Asterina gibbosa</i> , une des deux espèces étudiées.	4
Figure 5	<i>Anneissia bennettii</i> .	4
Figure 6	<i>Holothuria edulis</i> .	4
Figure 7	Dissection du système nerveux superficiel.	5
Figure 8	Biosphère marine.	6
Figure 9	<i>Asterias rubens</i> .	7
Figure 10	<i>Asterina gibbosa</i> , une des deux espèces étudiées.	8
Figure 11	Schéma de l'anatomie externe générale de l'étoile de mer.	9
Figure 12	Face orale d'un bras de <i>Asterias rubens</i> .	9
Figure 13	Extrémité d'un bras de <i>Asterias rubens</i> .	10
Figure 14	Plaque madréporite de <i>Asterias rubens</i> .	11
Figure 15	Schéma d'une coupe d'épiderme de <i>Asterias rubens</i> .	11
Figure 16	Endosquelette d'une étoile de mer décomposée sur une plage.	12
Figure 17	Schéma d'une coupe d'étoile de mer, avec l'endosquelette visible.	12
Figure 18	Etoile de mer dévaginant son estomac.	13
Figure 19	Anatomie digestive de <i>Asterias rubens</i> .	13
Figure 20	Schéma du système aquifère.	14
Figure 21	Coupe sagittale d'un podion.	14
Figure 22	Schéma du système hémal chez les étoiles de mer.	15
Figure 23	Schéma d'une coupe de disque et du début d'un bras d'étoile de mer.	16
Figure 24	Schéma du système nerveux principal de l'étoile de mer.	17
Figure 25	Schéma d'une coupe transversale du cordon nerveux radiaire	18
Figure 26	Schéma annoté d'une coupe de bras de <i>Asterias rubens</i> .	18

Figure 27	Schéma d'une coupe de la paroi du tube digestif de l'étoile de mer représentant la neuroanatomie de ce tissu.	19
Figure 28	Chronogramme des manipulations effectuées concernant la réalisation de coupes histologiques.	22
Figure 29	Réaction entre le formaldéhyde et la protéine.	24
Figure 30	Bras de <i>Asterias rubens</i> dans une solution de Bouin.	24
Figure 31	Schéma de microscope électronique à balayage, avec en rouge, le faisceau d'électrons.	25
Figure 32	Chambre à pression.	26
Figure 33	Echantillons sur les supports pour la métallisation.	27
Figure 34	<i>Asterina gibbosa</i> après fixation au PAF, décalcification et déshydratation.	28
Figure 35	Bloc de paraffine fixé sur le support en bois.	29
Figure 36	Microtome Microm HM 340 E avec bloc de paraffine fixé.	29
Figure 37	Schéma représentant la fixation de l'anticorps primaire sur la protéine d'intérêt.	32
Figure 38	Schéma représentant la fixation de l'anticorps secondaire sur l'anticorps primaire.	32
Figure 39	Schéma représentant la réaction immunohistochimique sur une protéine.	33
Figure 40	Observations au binoculaire de <i>Asterina gibbosa</i> .	35
Figure 41	Observations au binoculaire de : <i>Asterias rubens</i> .	37
Figure 42	Observations au microscope électronique à balayage de <i>Asterina gibbosa</i> .	39
Figure 43	Coupes de <i>Asterina gibbosa</i> .	40
Figure 44	Coupes de <i>Asterina gibbosa</i> .	43
Figure 45	Coupes de <i>Asterina gibbosa</i> .	44
Figure 46	Coupes de <i>Asterina gibbosa</i> .	45
Figure 47	Coupes de <i>Asterina gibbosa</i> .	47
Figure 48	Coupes de <i>Asterina gibbosa</i> .	48
Figure 49	Coupes de <i>Asterina gibbosa</i> .	50
Figure 50	Coupes de <i>Asterias rubens</i> .	52

Figure 51	Coupes de <i>Asterias rubens</i> .	53
Figure 52	Modèles de l'application MetaMorphos .	58

Table des tableaux

Tableau 1	Tableau récapitulatif des zones marquées.	57
-----------	---	----

Glossaire

Benthique	Vit dans la zone de fond marin, sur le substrat.
Cellules ciliés	Les cellules qui composent l'épithélium sont équipées de cils vibratiles.
Coelomates	Les coelomates sont des animaux triploblastiques (animaux dont l'embryon s'organise en trois feuillet embryonnaires au cours de la gastrulation. Ces trois feuillet sont l'ectoderme, l'endoderme et, particularité des triploblastiques, le mésoderme) qui possèdent un coelome, c'est-à-dire une cavité interne secondaire limitée par un troisième tissu qui se différencie lors du développement embryonnaire.
Cordon nerveux circumoral	Cordon nerveux circulaire autour de la bouche.
Deutérostomien	Animal dont le développement embryonnaire donne au blastopore la fonction d'anus, la bouche se formant secondairement.
Endosquelette	Squelette interne.
Epiderme	Couche superficielle du tégument.
Epithélium coelomique	Epithélium de la cavité générale.

Hermaphrodisme	Phénomène biologique dans lequel l'individu est morphologiquement mâle et femelle, soit simultanément soit alternativement.
Hermaphrodisme Protandre	Les tissus mâles sont fonctionnels durant la première partie de la vie de l'individu puis cessent leur activité. Les tissus femelles deviennent alors fonctionnels.
Mésoderme	Feuillet cellulaire intermédiaire de l'embryon des animaux triploblastiques.
Métazoaires	Nom de clade désignant les animaux. Les organismes ainsi qualifiés sont des eucaryotes (ont des cellules nucléées), multicellulaires, hétérotrophes.
Péristome membranaire	Zone entourant la bouche des échinodermes. « Péristome membranaire » = membrane autour de la bouche.
Photocyte	Cellule spécialisée dans la production de lumière.
Réticulation	Formation d'un ou de plusieurs réseaux tridimensionnels, par voie chimique ou physique.
Sillon ambulacraire	Sillon de la face ventrale des étoiles de mer où s'attachent les podia.
Symétrie penta-radiaire	Symétrie d'ordre 5.

1. Introduction

Malgré la grande diversité des études scientifiques spécifiquement menées sur le système nerveux des échinodermes, celui-ci reste énigmatique pour les scientifiques. Les rares informations sur le système nerveux décentralisé des étoiles de mer (*c.à.d.*, une classe spécifique d'échinodermes) concernent principalement leurs larves techniquement plus simples à « manipuler ».

Le présent travail a été mené au sein du laboratoire de Biologie des Organismes Marins et Biomimétisme de l'Université de Mons (Institut des Biosciences, Belgique). Les axes de recherche du laboratoire sont variés mais concernent globalement la biologie des échinodermes : aquaculture, symbioses et maladies, matériaux biologiques et biomimétisme mais aussi la perception extraoculaire de ses organismes sans tête ! C'est à ce dernier axe de recherche que se rattache cette étude.

L'**objectif** de ce travail est de mieux comprendre l'organisation générale et l'anatomie des systèmes nerveux décentralisé et principaux des étoiles de mer ainsi que les acteurs principaux de ces deux systèmes. Pour ce faire, les espèces européennes *Asterias rubens* (l'étoile commune) et *Asterina gibbosa* (l'astérie bossue) ont été choisies comme espèces modèles. Ce travail a mené à la description générale du système nerveux des deux espèces étudiées ainsi qu'à leur comparaison morphologique en se basant sur des techniques d'immunologie, d'histologie, de microscopie électronique et photonique. En parallèle, le travail a permis d'aider à la reconstruction tridimensionnelle d'une étoile de mer adulte « prototypique », réalisée par un infographiste du laboratoire.

Le travail écrit se compose de plusieurs parties :

La partie théorique :

Elle reprend les généralités anatomiques et biologiques des étoiles de mer sur base d'une analyse de la littérature disponible. La partie théorique reprend également les informations disponibles sur le système nerveux des échinodermes en général et des étoiles de mer en particulier.

La partie matériel et méthode :

Elle présente et décrit les différentes étapes méthodologiques réalisées dans le cadre de ce travail. L'utilisation du binoculaire et du microscope électronique à balayage sont nécessaires à la description de l'anatomie externe des étoiles de mer. La microtomie, les colorations topographiques, les immunodétections sur coupes et la microscopie photonique ont été utilisés pour analyser les marquages immunohistochimiques d'acteurs du système nerveux dans un contexte morphologique général.

La partie résultats :

La partie résultat présente les clichés réalisés lors des observations à la loupe binoculaire et lors de l'utilisation du microscope électronique à balayage. Une description de l'anatomie externe découlant de l'utilisation de ces deux méthodes est présentée. Elle reprend aussi les clichés des immunodétections sur les coupes les plus pertinentes dans le cadre de ce travail et leur description.

La partie discussion et conclusion :

La partie discussion compare les anatomies externes des deux étoiles sur base des clichés obtenus lors des observations à la loupe binoculaire et au microscope électronique à balayage.

Elle compare aussi les résultats d'immunohistochimie à la littérature et relève les points pertinents.

La conclusion reprend les points importants de la discussion et souligne les perspectives qu'ouvre ce travail.

2. Partie théorique

2.1 Généralité sur les échinodermes

Les échinodermes, du grec *echinos* = épine et *derma* = peau, forment un embranchement d'animaux exclusivement marins. Ce sont des métazoaires coelomates et deutérostomiens.

Le phylum des échinodermes compte 5 classes (Fig.1) (Ruppert et Barnes 1994). D'une part les *Echinoidea* (Fig.2) reprenant les oursins, les *Ophiuroidea* qui regroupent les ophiures (Fig.3), les *Crinoidea* (Fig.4) qui englobent les crinoïdes, les *Asteroidea* (Fig.5) qui comprennent les étoiles de mer et enfin les *Holothuroidea* (Fig.6) qui regroupent les concombres de mer.

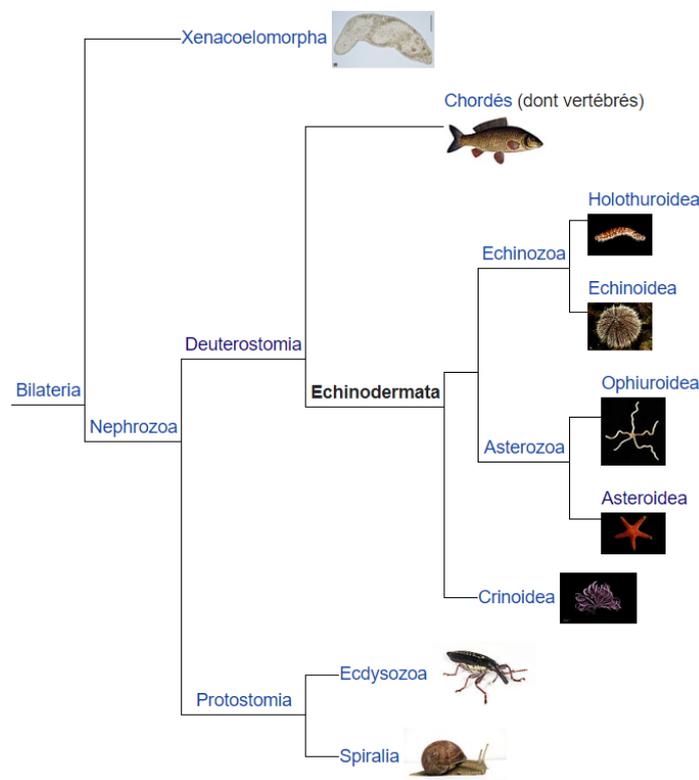


Figure 1 Arbre phylogénétique des bilatériens (Telford et al. 2014).



Figure 3 Oursin blanc de méditerranée. Source ¹



Figure 2 *Ophiolepis superba*. Source ²



Figure 4 *Anneissia bennettii*. Source ³



Figure 5 *Asterina gibbosa*, une des deux espèces étudiées. Source ⁴



Figure 6 *Holothuria edulis*. Source ⁵

Une des particularités des échinodermes est leur symétrie bilatérale au stade larvaire. Ils acquièrent ensuite leur symétrie pentaradiée lors de leur métamorphose du stade larvaire au stade adulte (Koehler, 1921).

¹ <https://www.aquaportail.com/definition-6247-oursin.html>

² <https://www.aquaportail.com/definition-446-ophiure.html>

³ http://www.cap-recifal.com/page/articles.html/_/vivant/crino%C3%AFdes-lys-de-mer-et-comatules-r96

⁴ <http://www.habitas.org.uk/marinelife/species.asp?item=ZB1130>

⁵ <https://www.aquaportail.com/definition-444-concombres-de-mer.html>

Les échinodermes possèdent un endosquelette⁶ calcaire composé de plaques rigides appelées ossicules. Ces ossicules peuvent être séparés les uns des autres comme chez les étoiles de mer, leur permettant une certaine mobilité, ou soudés en une coque rigide, comme chez les oursins. Ils ne possèdent pas de système vasculaire à proprement parler. L'absence de système vasculaire est compensée par d'autres systèmes spécifiques à ce phylum : le système aquifère, le système hémal et le système périhémal. Le système aquifère est composé de canaux remplis d'eau de mer, dont la composition varie légèrement par rapport à l'eau de mer extérieure. Via les podia, le système aquifère est principalement impliqué dans la locomotion mais il peut aussi assurer aussi quelques-unes des fonctions typiques du « sang » tel que les échanges gazeux et le transport des nutriments (Beaumont et Cassier, 1983).

Les échinodermes n'ont pas de cerveau et possèdent un système nerveux principal relativement simple composé d'un anneau nerveux autour de la bouche d'où partent des cordons nerveux selon une structure radiaire (Fig.7).

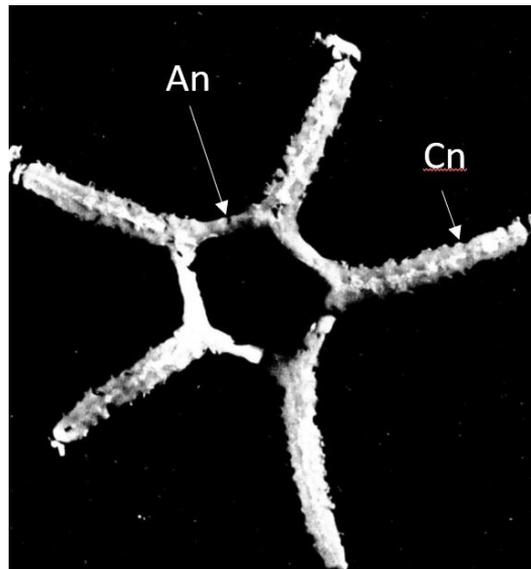


Figure 7 Dissection du système nerveux superficiel. An : anneau nerveux ou cordon nerveux circumoral. Cn : cordon nerveux radiaire (Huet, 1975).

Les échinodermes peuvent être carnivores, omnivores, charognards, herbivores ou filtreurs (Ruppert et Barnes, 1994).

Il n'existe pas de dimorphisme sexuel chez les échinodermes. Ils se reproduisent en relâchant leurs gamètes au gré des courants.

⁶ Squelette interne

Une fois la fécondation effectuée, les larves évoluent parmi le plancton et subissent des métamorphoses propres à chaque classe. Aux stades larvaires, les échinodermes ont une symétrie bilatérale.

Les larves des échinodermes sont dites pélagiques. Elles vivent en pleines eaux parmi le plancton. Les adultes sont quant à eux benthiques. Ils vivent sur les fonds marins. Certaines espèces d'oursins vivent même dans le substrat : elles sont dites endobenthiques (Fig.8) (Hyman 1955).

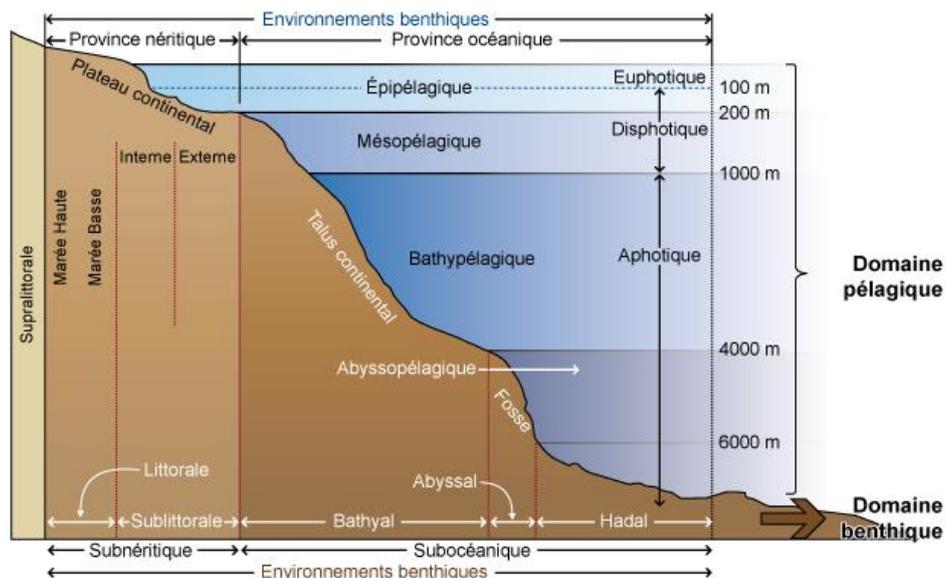


Figure 8 Biosphère marine. Source ⁷

Les étoiles de mer forment la classe des Asteroidea, et comprennent pas moins de 1500 espèces. Ce sont des invertébrés appartenant au phylum Echinodermata (Ruppert et Barnes 1994).

⁷ http://www.cima.ualg.pt/piloto/UVED_Geochemie/UVED/site/html/2/2-3/2-3-1/index.html

2.2 Espèces étudiées

Classe : Asteroidea

Ordre : Forcipulatida

Famille : Asteriidae

Nom scientifique : *Asterias rubens* (L. 1758)

Nom commun : Etoile de mer commune, Astérie rouge



Figure 9 *Asterias rubens* Source : ©Maran

La première espèce étudiée est *Asterias rubens* Linneaus, 1758 (Fig.9) aussi appelée étoile de mer commune.

On la retrouve dans tout l'océan Atlantique, principalement dans le nord-est. Elle est totalement absente dans la Méditerranée (Picton, 1983).

Le diamètre moyen de cette étoile de mer est de 15 cm mais elle peut parfois en atteindre 50 cm. La coloration du tégument est très variable : du brun à l'orange en passant par le mauve.

Sa reproduction est sexuée et se passe au printemps : relâchement des gamètes en eaux libres. Une fois les gamètes fécondés, ils se transforment en œufs qui donneront des larves. Après une succession de différentes phases qui durent au total une vingtaine de jours, on obtiendra une petite étoile.

Elle vit sur tout type de sol, mais plus particulièrement les surfaces rocheuses, allant jusqu'à 650m de profondeur occasionnellement (Beaumont et Cassier, 1983 ; Weinberg, 2004).

Classe : Asteroidea

Ordre : Valvatida

Famille : Asterinidae

Nom scientifique : *Asterina gibbosa* (P. 1777)

Nom commun : Astérie bossue



Figure 10 *Asterina gibbosa* (©Skewes)

La seconde espèce étudiée est *Asterina gibbosa* (Pennant, 1777) (Fig.10).

L'astérie bossue est présente dans toute l'Atlantique Nord-Est et en méditerranée. C'est une espèce photophobe qui se cache la journée pour ne sortir que la nuit (Castric, 1987). Elle est principalement présente en petite profondeur mais on peut la retrouver jusqu'à 100 mètres de profondeur.

Elle doit son nom au fait que ses bras suivent une forme plate, tandis que son disque face dorsale est bombé.

Elle est plus petite que l'astérie rouge. Elle a un diamètre de 7 cm. Ses bras sont courts et trapus, le disque central est plus grand que la longueur des bras, ce qui lui donne une forme de pentagone (Luther, 1987).

Sa reproduction est particulière car c'est une étoile hermaphrodite protandre⁸. Après fécondation, l'étoile pond des œufs sur le substrat. Il n'y a pas de phase « libre », larvaire, entre la ponte et la forme « finale » de l'étoile. Dès que l'œuf éclot, une petite étoile déjà formée en sort (Emson, 1983).

⁸ Les tissus mâles sont fonctionnels durant la première partie de la vie de l'individu puis cessent leur activité. Les tissus femelles deviennent alors fonctionnels.

2.3 Morphologie externe des espèces étudiées

La nomenclature décrit la face ventrale comme étant la face orale et la face dorsale la face aborale (Fig.11).

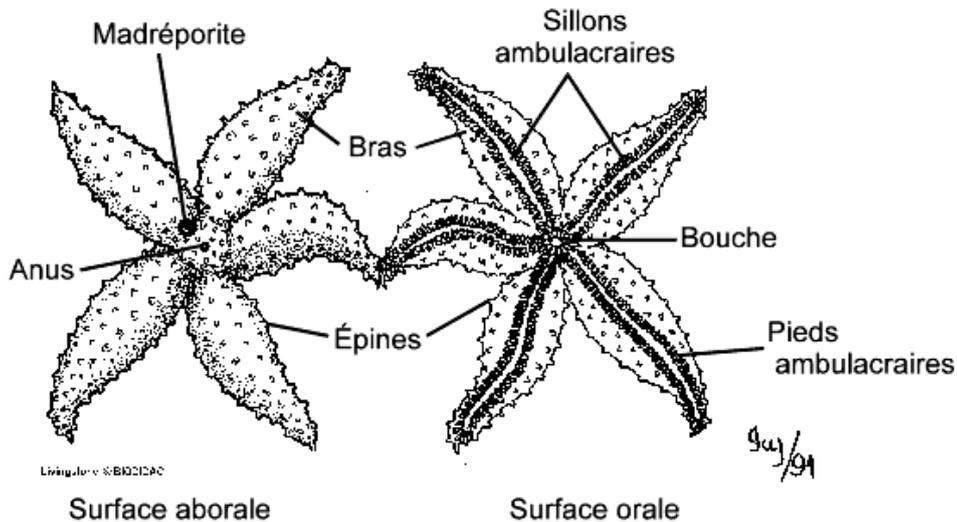


Figure 11 Schéma de l'anatomie externe générale de l'étoile de mer. Source⁹

Au centre de la face ventrale de l'étoile de mer se trouve la bouche. Elle est entourée d'un péristome¹⁰ membranaire d'où partent des sillons ambulacraires¹¹, à raison d'un par bras. Ils sont protégés latéralement par des rangées de piquants. Ceux-ci sont entourés de rangées de pieds ambulacraires aussi nommés podia locomoteurs (Fig.12). Les podia sont constitués de cellules sensorielles et permettent à l'étoile de se déplacer (Hyman 1955).

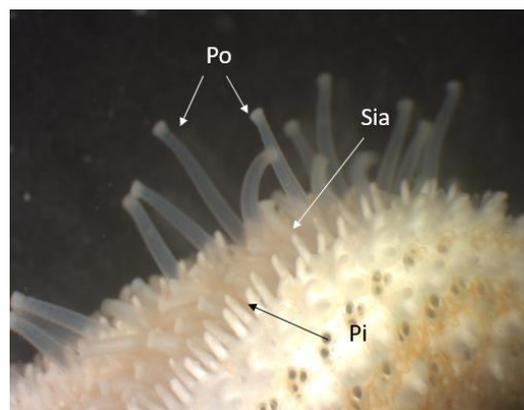


Figure 12 Face orale d'un bras de *Asterias rubens*. Po : podia. Sia : sillon ambulacraire. Pi : piquant © J. Delroisse

⁹ <http://simulium.bio.uottawa.ca/bio2525/labo/Protocoles/echinode.htm>

¹⁰ Zone entourant la bouche des échinodermes. « péristome membranaire » = membrane autour de la bouche.

¹¹ Sillon de la face ventrale des étoiles de mer où s'attachent les podia.

A l'extrémité de chaque sillon ambulacraire se trouve un ocelle. Œil simple rouge orangé, ayant des rôles à la fois tactile, sensoriel, olfactif et photosensible (Fig.13). On remarquera aussi la présence de tentacules terminaux (Hyman, 1955 ; Beaumont et Cassier, 1983).

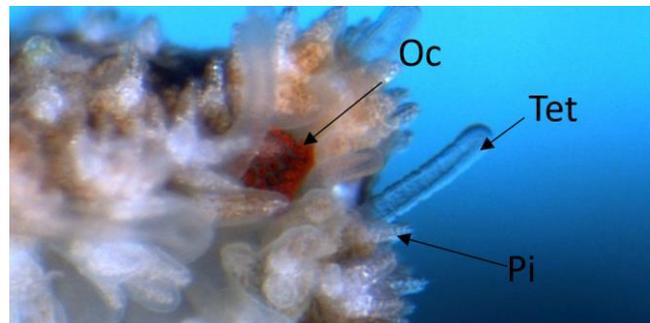


Figure 13 Extrémité d'un bras de *Asterias rubens*, avec la tâche oculaire bien visible ainsi que les tentacules terminaux. Oc : ocelle. Tet : tentacule terminal. Pi : piquant. Source¹²

Le tégument de la face aborale est rugueux et épineux. Cela est dû à la forme du squelette sous-jacent, bien que les épines et autres irrégularités ne soient pas fusionnées avec celui-ci.

Les piquants sont des excroissances rigides et calcaires de défense. Ils sont portés par les plaques du squelette, et sont articulés. Ils sont composés de calcite et recouverts d'épiderme. La base de chaque piquant présent sur la surface dorsale de l'étoile de mer est entourée par des pédicellaires (Hyman 1955).

Les pédicellaires ressemblent à de petites mâchoires et sont des organes de défense et de nettoyage de la peau. Elles ont une structure osseuse semblable à l'endosquelette.

La surface dorsale charnue est recouverte de papules, petits sacs dont la membrane interne possède des cellules ciliées, servant à la respiration. Celles-ci sont rétractiles et en contact avec la cavité générale et permettent les transferts gazeux (Beaumont et Cassier 1983).

En position interradiaire se trouve la madréporite, point d'entrée du système aquifère (Fig.14). L'étoile de mer possède un anus qui permet l'évacuation des matières fécales.

¹² https://www.sciencesetavenir.fr/fondamental/biologie-cellulaire/etoile-de-mer-un-oeil-au-bout-des-bras_37891

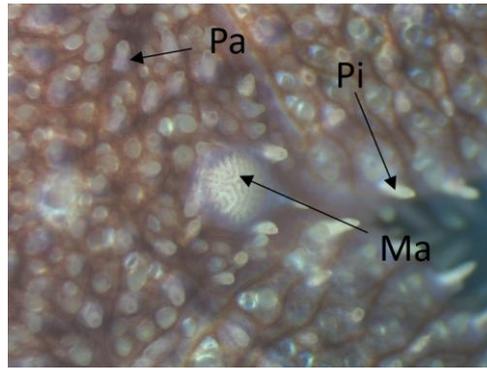


Figure 14 Plaque madreporite de *Asterias rubens*. Pa : papule. Pi : piquant. Ma : madreporite. Source : © J. Delroisse

2.4 Morphologie interne des espèces étudiées

L'étoile de mer est recouverte d'un tégument¹³ relativement épais.

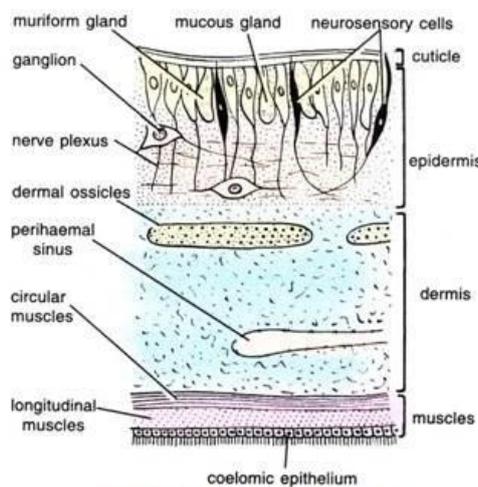


Figure 15 Schéma d'une coupe d'épiderme de *Asterias rubens*. Source¹⁴

La partie la plus externe du tégument est recouverte d'une cuticule composée de deux couches. La cuticule la plus externe étant la plus épaisse. Sous la cuticule se trouve l'épiderme¹⁵ composé, de divers types de cellules : des cellules ciliés¹⁶, des neurosensorielles, des glandulaires, nerveuses, ... (Fig.15). Les cellules glandulaires sont étendues jusqu'à l'épiderme de la face dorsale où se situe leur ouverture, permettant en cas d'irritations (attaque de prédateurs par exemples) de produire un mucus gélatineux à des fins de protections (Hyman 1955).

¹³ Tissu vivant qui recouvre le corps.

¹⁴ <http://www.notesonzoology.com/marine-animals/study-notes-on-asterias-echinodermata/1717>

¹⁵ Couche superficielle du tégument

¹⁶ Les cellules qui composent l'épithélium sont équipées de cils vibratiles

Vient ensuite le derme. C'est un tissu conjonctif fibreux, développé à partir du mésoderme¹⁷. C'est la couche la plus épaisse. La couche musculaire est constituée de fibres musculaires. Et enfin la couche la plus interne du tégument : l'épithélium coelomique¹⁸.

L'étoile de mer possède un endosquelette poreux situé dans la couche dermique du tégument. Il lui permet d'être souple et rigide à la fois (Hyman 1955).



Figure 16 Endosquelette d'une étoile de mer décomposée sur une plage. Source¹⁹

Ce squelette calcaire composé de carbonate de calcium est constitué de plaques ambulacraires calcaires, aussi appelés ossicules. Les ossicules sont discontinus et présents dans tout l'animal (Fig.16 ; 17). Ils sont formés dans une cellule spécialisée que l'on retrouve dans le derme: le sclérobaste (Beaumont and Cassier, 1983). Les ossicules sont nombreux dans les bras et leur rôle est de les soutenir (Fig.17). Les ossicules de la face aborale sont perforés afin de laisser le passage aux podia locomoteurs (Hyman, 1955).

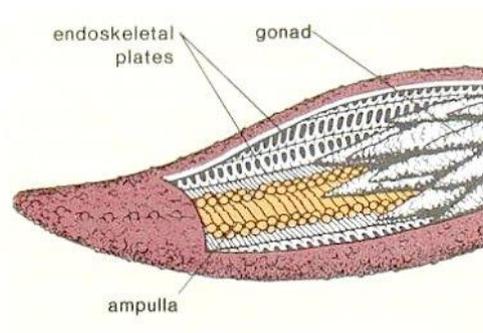


Figure 17 Schéma d'une coupe d'étoile de mer, avec l'endosquelette visible. Source²⁰

¹⁷ Feuillet cellulaire intermédiaire de l'embryon

¹⁸ Epithelium de la cavité générale

¹⁹ <https://www.zoom-nature.fr/echinodermes-un-squelette-a-fleur-de-peau/>

²⁰ <http://www.notesonzoology.com/marine-animals/study-notes-on-asterias-echinodermata/1717>

L'étoile de mer est constituée de différents types de plaque, notamment de la plaque dorsale, des plaques marginales ventrales, de 2 plaques ambulacraires et de 2 plaques adambulacraires²¹. (Beaumont et Cassier, 1983). Le disque central de l'étoile comporte 5 plaques, disposées de façon régulière autour de la bouche. Une membrane péristomiale entoure la bouche et est tendue sur celle-ci (Beaumont and Cassier 1983).

La bouche est le point d'entrée du système digestif. Un court œsophage relie la bouche et l'estomac cardiaque (Beaumont and Cassier, 1983). L'estomac cardiaque est replié sur lui-même et occupe pratiquement tout le disque central à lui seul. Pour se nourrir, *Asterias rubens* et *Asterina gibbosa* sont capables de digérer partiellement leurs proies à l'extérieur de leur corps. Pour ce faire, elles dévaginent²² (Fig.18) leur estomac cardiaque et englobent leur proie, celle-ci est digérée par les enzymes digestives produites par l'estomac. L'étoile réenvagine ensuite son estomac contenant la proie liquéfiée (Clark et al, 1992). Cela est rendu possible grâce au système rétracteur stomacal : les poches cardiaques sont reliées à l'endosquelette de l'étoile par une paire de ligaments triangulaires (Jangoux, 1982).

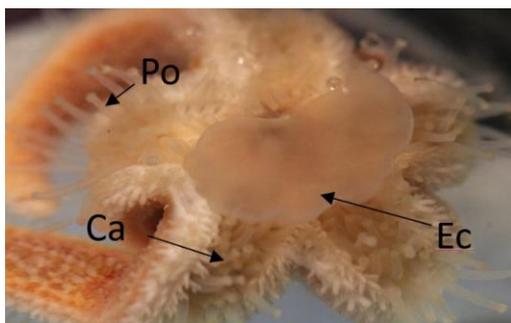


Figure 18 Etoile de mer dévaginant son estomac. Ca : sillon ambulacraire. Ec : estomac cardiaque. Po : podia. Source : © J. Delroisse

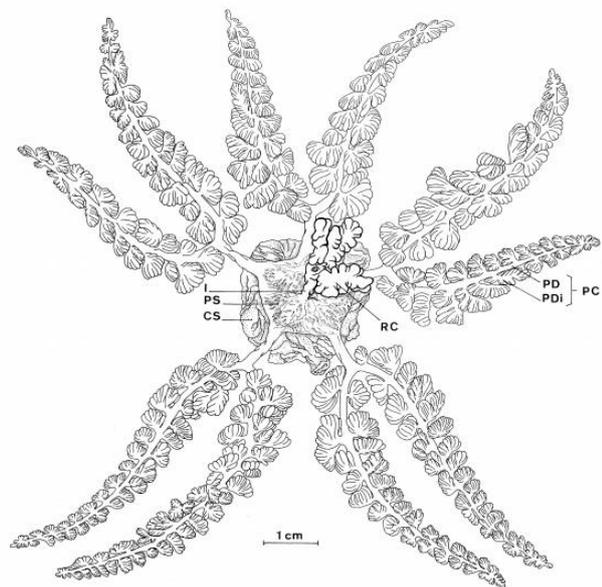


Figure 19 Anatomie digestive de *Asterias rubens*
 CS : estomac cardiaque I : intestin. PDi :
 diverticule pylorique PS : estomac pylorique RC :
 caeca rectaux. PC : caeca pyloriques PD : canal
 pylorique (Jangoux 1982)

²¹ Ces plaques sont situées à la surface opposée des plaques ambulacraires

²² Retourner un organe pour le déployer vers l'extérieur.

La digestion se poursuit alors dans l'estomac pylorique. Celui-ci est subdivisé dans chaque bras en deux glandes digestives : les caecae pyloriques. Ces dernières servent également de zones de stockage des éléments nutritifs de l'étoile de mer (Fig.19). Sur la face aborale de l'estomac pylorique se situent de courts intestins débouchant sur l'anus (Jangoux, 1982).

Les étoiles de mer sont capables de se déplacer, de saisir leurs proies et de respirer (en plus des papules) grâce à leur système aquifère ou ambulacraire. L'eau entre par les micropores de la plaque madréporite et passe par le canal hydrophore ou canal du sable (Fig.20 ; 23). Elle est ensuite envoyée dans l'anneau aquifère et est redistribuée dans chaque canal radiaire qui irrigue les canaux latéraux. Ensuite, elle s'infiltre dans les ampoules et dans les podia via des interstices, des « pores » ambulacraires à travers les plaques ambulacraires. Nous retrouvons ainsi d'un côté l'ampoule, et de l'autre, le podion (Fig.21).

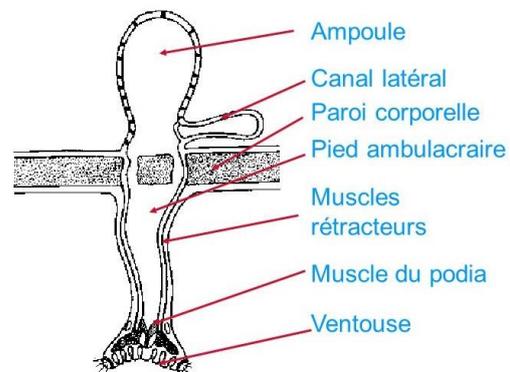
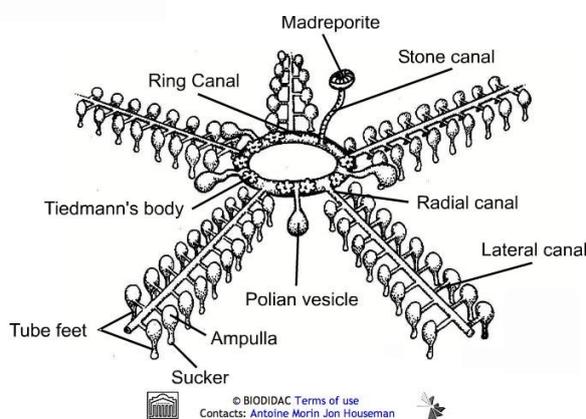


Figure 20 Schéma du système aquifère. Source²³ Figure 21 Coupe sagittale d'un podion. Source²⁴

Quand l'étoile de mer contracte les muscles de ses ampoules, l'eau est propulsée dans le tube reliant l'ampoule et le podion. Celui-ci s'allonge sous l'effet de la pression. Pour rétracter ses podia, l'étoile contracte les muscles de la paroi du tube reliant l'ampoule et le podion, elle va donc se déplacer vers son point d'ancrage.

L'étoile de mer possède aussi des systèmes hémal et périhémal. Il y a très peu d'informations dans la littérature concernant ces deux systèmes.

²³ et ²⁴ http://ressources.unisciel.fr/zoologie/Echinodermes/Planche_Echinodermes.htm

Ils font office de système vasculaire, sont très peu développés et ont un rôle minime dans la circulation. Le système hémal est l'appareil circulatoire proprement dit.

Il permet le transport d'un liquide contenant des substances organiques, notamment les nutriments et irrigue le système nerveux et les gonades. Il ne possède pas de vaisseaux sanguins. Les canaux hémaux et périhémaux ne sont pas délimités par des parois, ils sont constitués de lacunes entre les organes.

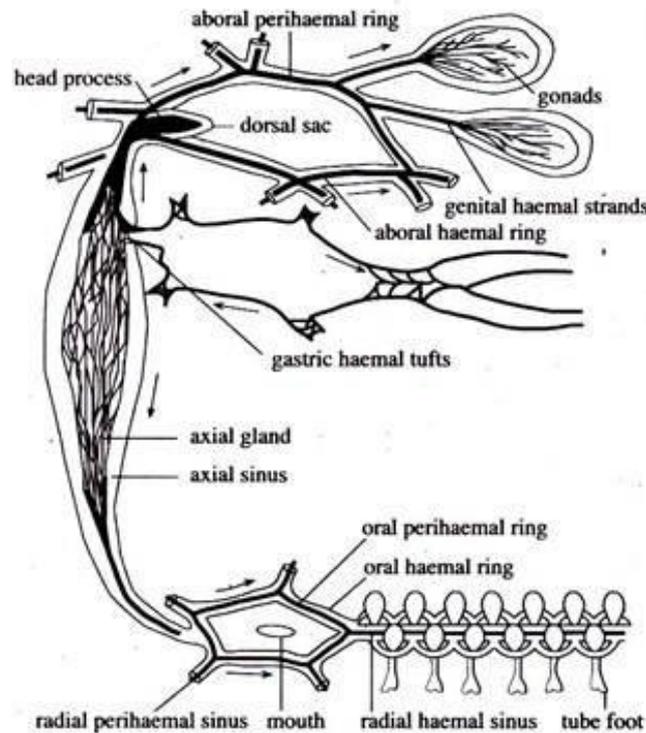


Figure 22 Schéma du système hémal chez les étoiles de mer. Source : © J. Delroisse

Le système hémal se compose de plusieurs parties : un anneau oral hémal lui-même entouré d'un anneau oral périhémal. Ceux-ci accompagnent l'appareil ambulacraire et irriguent les podia. Au niveau aboral, un anneau hémal, toujours entouré par un anneau périhémal, irrigue les gonades. Les anneaux oraux et aboraux sont reliés entre eux par des canaux hémaux et périhémaux. (Fig.22 ; 23).

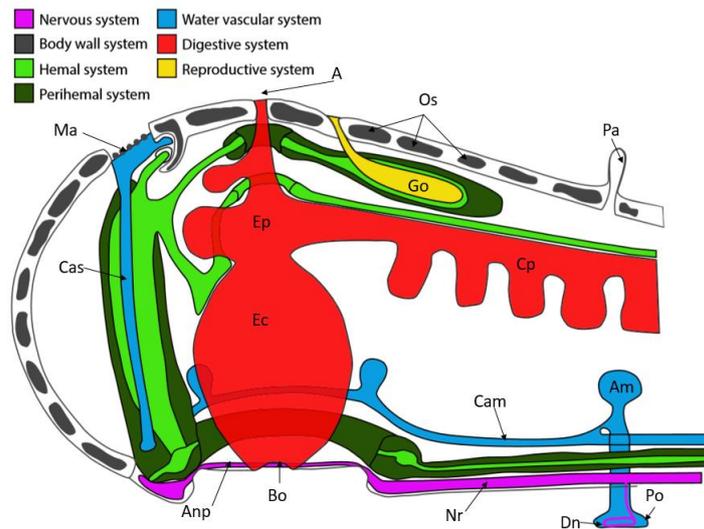


Figure 23 Schéma d'une coupe de disque et du début d'un bras d'étoile de mer. Ma : madréporite. Cas : aanal du sable. A : anus. Ep : estomac pylorique. Ec : estomac cardiaque. Bo : bouche. Cp : caecum pylorique. Os : ossicules. Go : gonades. Pa : papule. Anp : anneaux nerveux péribuccal. Nr : nerf radiaire. Dn : disque nerveux. Cam : sillon ambulacraire. Am : ampoule. Po : podion. Source : © J. Delroisse

2.5 Le système nerveux

À ce jour, le système nerveux des échinodermes et plus particulièrement des étoiles de mer n'a été que peu étudié. La plupart des informations collectées ne font mention que du système nerveux principal et de l'étude du système nerveux chez les larves (Mashanov et al., 2007).

Le système nerveux des étoiles de mer est décentralisé et composé de plusieurs parties :

- Le système nerveux principal, composé du cordon nerveux circumoral ou péribuccal²⁵ et des nerfs radiaires et marginaux.
- Le système nerveux périphérique plus diffus situé au niveau des podia, de la peau et des viscères. L'étoile de mer est dite « épithélioneurienne ». Une couche de cellules nerveuses est située juste sous l'épiderme externe et viscéral, sur la face interne de celui-ci (García-Arrarás et al, 2001).

²⁵ Cordon nerveux circulaire autour de la bouche

2.5.1 Le système nerveux principal

Il est constitué d'un anneau péribuccal situé du côté de la face orale d'où émergent 5 cordons nerveux radiaires, un pour chaque bras. Ceux-ci sont localisés en dessous des canaux ambulacraires (Fig.24).

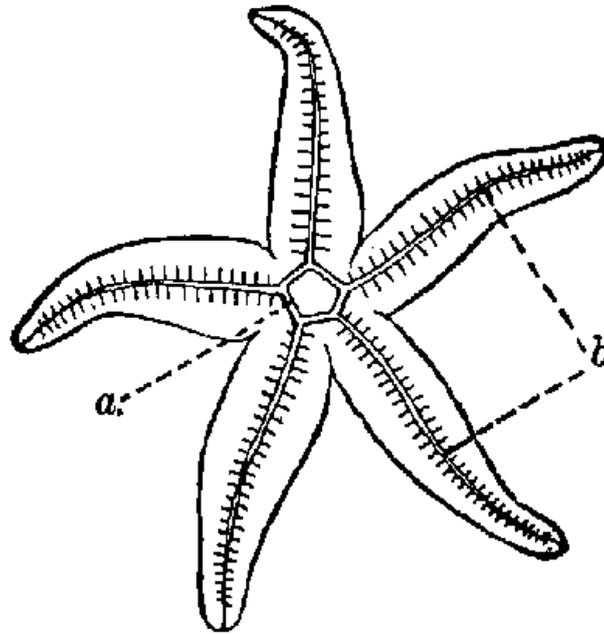


Figure 24 Schéma du système nerveux principal de l'étoile de mer. a: anneau nerveux péribuccal. b: cordons nerveux radiaires. (Rowland, 1904)

Les cordons nerveux radiaires et l'anneau nerveux sont tapissés de deux couches de cellules nerveuses : une couche ectoneurale sur la face orale des cordons nerveux et une couche plus mince hyponeurale sur la face dorsale. Elles sont divisées par une fine couche de tissus conjonctif. La couche ectoneurale est organisée en deux zones : une externe composée de corps cellulaires et une interne composée principalement d'axones²⁶ et traversée par des fibres de cellules de soutien (Fig.25) (Mashanov, 2008).

²⁶ Région riche en axones, les axones sont des prolongements fibreux des neurones qui conduisent l'influx nerveux

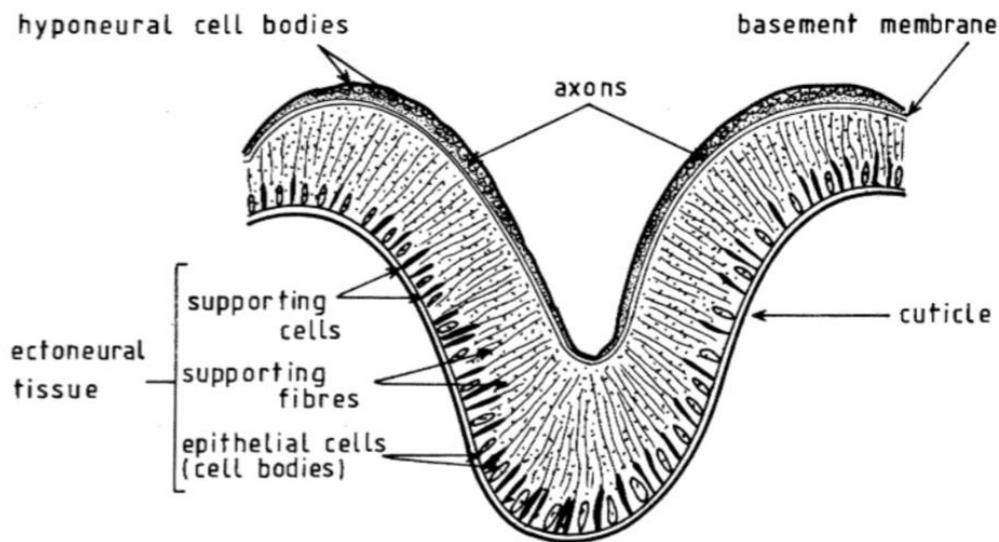


Figure 25 Schéma d'un coupe transversale du cordon nerveux radiaire (Elphick, et al 1989)

La couche ectoneurale a une fonction à la fois sensorielle et motrice. Elle innerve les podia, les viscères ainsi que le tégument en général et rejoint le plexus nerveux sous-épithélial. Au niveau de ces muscles, la paire de nerfs fusionne avec un ruban de nerf hyponeural pour former les nerfs marginaux (Fig.26).

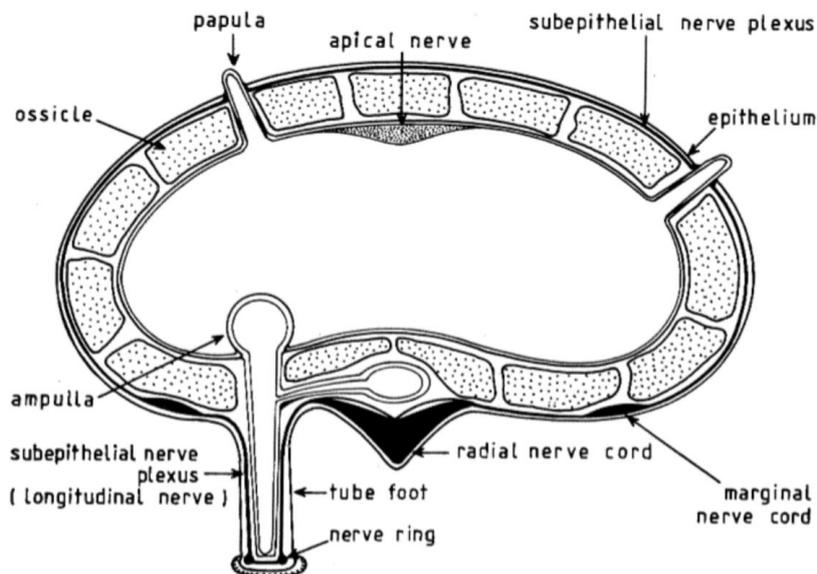


Figure 26 Schéma annoté d'une coupe de bras de *Asterias rubens* (Elphick, Emson, et Thorndyke 1989)

Le plexus nerveux hyponeural quant à lui n'a qu'une fonction motrice : il innerve les muscles de la paroi corporelle. Les nerfs radiaires se divisent en nerfs périphériques afin d'innover les muscles somatiques adjacents (Zueva et al. 2017).

A l'extrémité des cordons nerveux radiaires se trouve un ocelle photosensible qui permet de percevoir la lumière ainsi que des podia sensoriels (e.g., en particulier le podion terminal appelé tentacule terminal) (Huet 1975).

2.5.2 Le système nerveux périphérique

Le plexus sous-épithélial est présent dans tout l'épiderme de l'animal. Dans les podia, ce dernier forme une gaine cylindrique qui s'épaissit au niveau du disque pour former des ganglions et un disque nerveux basal (Fig.27).

Un plexus nerveux, dit viscéral, est aussi associé à l'épithélium coelomique. Il entoure les viscères et possède des fibres intimement liées à la musculature viscérale.

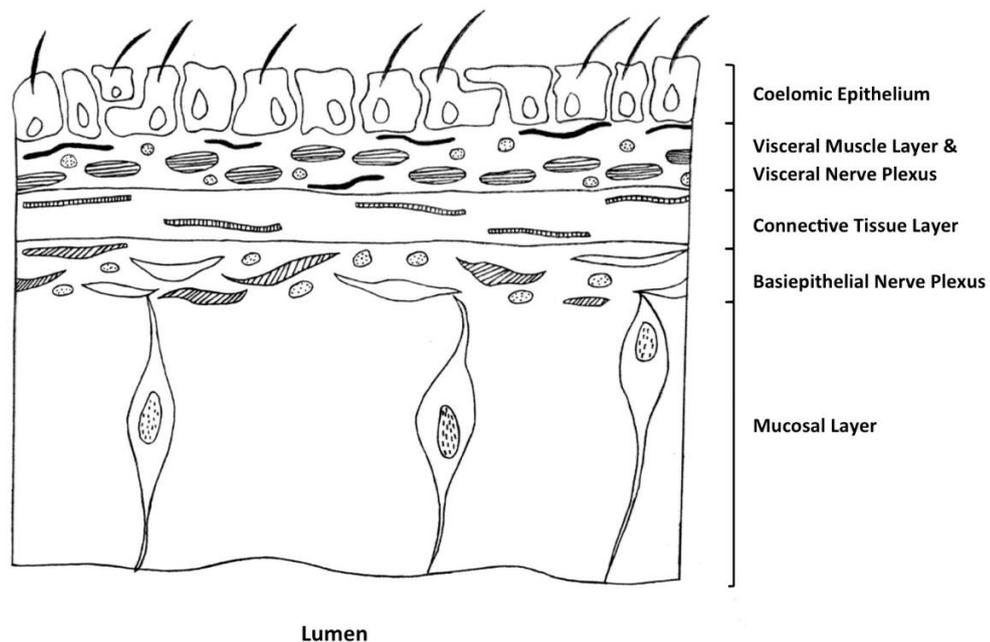


Figure 27 Schéma d'une coupe de la paroi du tube digestif de l'étoile de mer représentant la neuroanatomie de ce tissu (SA, 2015)

Ce plexus nerveux est présent dans tout le système digestif : de l'œsophage à l'anus. Il est aussi présent dans le système respiratoire des concombres de mer (García-Arrarás et al. 2001).

2.6 Marqueurs neuronaux

Une recherche bibliographique poussée a été effectuée afin de sélectionner les anticorps utilisés dans ce travail. Un tableau en annexe (voir annexe 8.9) synthétise ces informations. Les marqueurs neuronaux utilisés dans ce travail ont été sélectionnés après cette recherche bibliographique.

2.6.1 Anticorps anti- α -tubuline acétylée

La tubuline est la protéine structurelle des microtubules. Elle est composée de deux sous unités : les tubulines α et les tubulines β . La tubuline est présente en quantité importante dans le système nerveux des vertébrés et invertébrés, notamment dans le cerveau. Des études au microscope électronique révèlent des réseaux filamenteux dans les axones. Ces réseaux filamenteux sont constitués de microtubules (Gozes, 1982).

L'anticorps anti- α -tubuline acétylée est anticorps qui cible une grande partie des cellules du système nerveux, autant chez les vertébrés que chez les invertébrés.

Il met en évidence toutes les zones pourvues de microtubules stables²⁷. Celles-ci sont particulièrement présentes dans les neurones.

D'après la littérature, la tubuline a déjà été ciblée à l'aide d'anticorps dans le cadre d'études concernant la régénération des échinodermes (García-Arrarás et al, 1999 ; García-Arrarás et al, 1993) et l'étude du système nerveux chez les ophiures (Zueva et al, 2017). En particulier, l'anticorps anti- α -tubuline acétylée marque les nerfs radiaires, le nerf circumoral, le plexus basiépithélial, subépithélial ainsi que le plexus viscéral chez les ophiures (c.à.d., classe sœur des étoiles de mer) (Zueva et al, 2017) mais il n'a jamais été utilisé chez les étoiles de mer adultes.

2.6.2 Anticorps anti-sérotonine

La sérotonine est un neurotransmetteur présent dans tout le règne animal. Chez les vertébrés, la sérotonine intervient dans plusieurs fonctions cérébrales basales : le contrôle du sommeil, les rythmes circadiens, l'alimentation et l'état émotionnel. (Wilkinson et Dourish, 1991).

Chez certains invertébrés, la sérotonine est impliquée dans la régulation de l'activité ciliaire des cellules ciliaires et la reproduction (Hay-Schmidt, 2000).

Chez les échinodermes, les études menées sur les larves montrent que la sérotonine est présente dans les ganglions et dans les bandes ciliaires, et qu'elle a donc un rôle dans le déplacement de la larve (Yaguchi et Katow 2003).

De rares études peu concluantes ont été menées chez les échinodermes adultes.

²⁷ Microtubule stable = microtubule possédant beaucoup de dimères de tubuline

En effet, aucune expression de sérotonine n'a pu être montrée au sein des neurones adultes. Ce neurotransmetteur est pourtant fortement exprimé chez les larves (Beer et al, 2001).

2.6.3 Anticorps « luciférase d'ophiure »

Les luciférases sont des enzymes ayant des rôles clés dans la bioluminescence. Celles-ci catalysent les réactions de bioluminescence en oxydant un substrat spécifique : la luciférine. Cette oxydation provoque l'émission d'un photon et donc de lumière (Loening et al, 2007).

Chez les échinodermes, 4 classes parmi les 5 possèdent des espèces lumineuses. Aucune espèce lumineuse n'a été découverte chez les Echinoidea.

Chez l'ophiure *Amphiura filiformis* dont la bioluminescence a été spécifiquement étudiée au sein du laboratoire de l'UMONS, La luciférase est exprimée principalement dans les photocytes (c.à.d., les cellules lumineuses) de l'animal présent uniquement au niveau des piquants (Delroisse, 2017). Les travaux du laboratoire ont mis en évidence une expression, plus faible, généralisée au système nerveux de l'ophiure. Cette luciférase, dont le gène peut aussi être exprimé chez les étoiles de mer non-lumineuses telle qu'*Asterias rubens*, constituerait un marqueur efficace du système nerveux des échinodermes.

3. Matériel et méthode

Le chronogramme suivant (Fig.28) représente le temps nécessaire aux différentes manipulations effectuées requises pour la réalisation des coupes topographiques et immunohistochimiques.

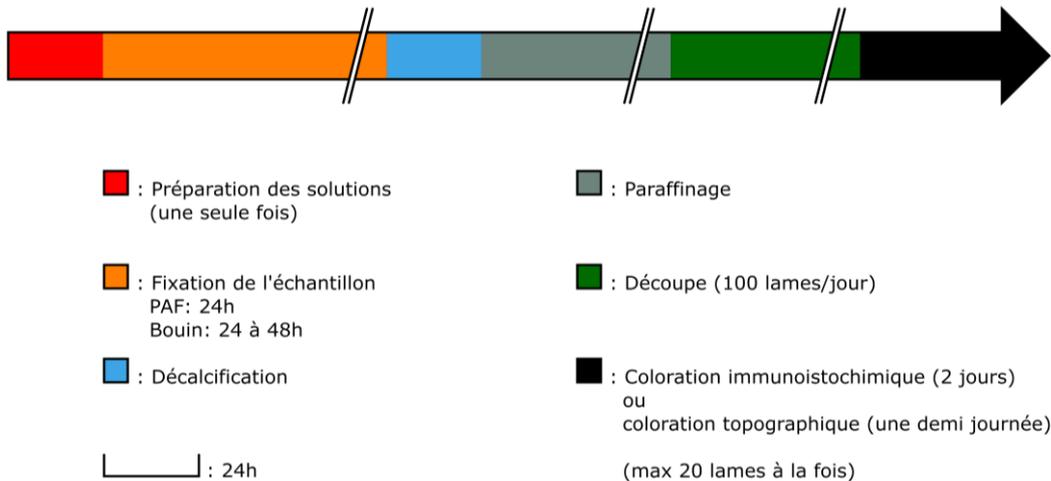


Figure 28 Chronogramme des manipulations effectuées concernant la réalisation de coupes histologiques

3.1 Récolte des spécimens et maintien

Asterias rubens est récoltée à marée basse à Audresselles dans le nord de la France. Aucune étoile n'a pu être récoltée lors de notre tentative.

Notre étude s'est donc basée sur des spécimens fournis par des collaborateurs :

- Les individus d'*Asterias rubens* Linnaeus ont été récoltés à la station marine de Kristineberg (Suède).
- Les individus *Asterina gibbosa* (Pennant, 1777) ont été récoltés à proximité de la station marine de Roscoff (Bretagne, France).

Les étoiles ont ensuite été placées dans les aquariums de maintenance du service de Biologie des Organismes Marins et Biomimétisme de l'Université de Mons.

3.2 Observations au binoculaire et anesthésie des étoiles

Les étoiles sont dans un premier temps observées au binoculaire Leica MZ8. Des clichés ont été pris avec la caméra Leica MC190HD. L'observation au binoculaire a pour but d'identifier l'anatomie vue en théorie et de comparer entre les anatomies externes de *Asterias rubens* et de *Asterina gibbosa*. Les clichés ont quant à eux été utilisés lors de la réalisation du modèle tridimensionnel de *Asterina gibbosa*.

Les étoiles sont observées sans anesthésie, afin d'examiner leurs déplacements et de localiser leurs papules et pédicellaires fonctionnels. Les observations sur les étoiles non anesthésiées sont compliquées : elles se déplacent et fuient la lumière du binoculaire. C'est pourquoi elles sont ensuite anesthésiées à l'aide de $MgCl_2$ à 3,5%, dans de l'eau de mer (Pugliese et al, 2016).

3.3 Dissection

La dissection post-anesthésie est nécessaire afin de (i) mieux appréhender l'anatomie interne de l'étoile de mer et de (ii) pouvoir sélectionner des organes pour une fixation.

C'est une étape préalable et nécessaire au reste des manipulations : les coupes étant en 2D, il était difficile de pouvoir identifier les tissus vus au microscope, notamment les différents estomacs.

Ces observations ont aussi permis d'aider un infographiste du laboratoire à réaliser modèle tridimensionnel de l'étoile de mer.

3.4 Fixation des tissus

Après une anesthésie au $MgCl_2$ à 3,5%, les étoiles sont plongées dans un fixateur.

Le rôle du fixateur est, comme son nom l'indique, de « fixer » les tissus. Il immobilise les cellules en reconstituant le gel protéique et permet de les conserver dans leur état d'origine. Il empêche la dégradation par les enzymes et les déséquilibres osmotiques, et ainsi la lyse ou la plasmolyse de la cellule (Venteo et Velot, 2010).

Deux types de fixateurs sont utilisés : une solution de paraformaldéhyde, où l'étoile est fixée durant 24h, et le liquide de Bouin où l'étoile est fixée durant 48h à 72h.

La solution de paraformaldéhyde se compose de 4% de paraformaldéhyde dissout dans du tampon phosphate salin (PBS, 4 g NaCl ; 0,1g KCl ; 0,725g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$; 0,12 g KH_2PO_4 ; 1 l d'eau milli-Q®). C'est un fixateur additif, il va créer des liaisons avec les protéines sans modifications de la structure générale ainsi qu'une fixation des lipides. Le fixateur au paraformaldéhyde est plus faible, la réticulation entre les protéines est moins intense mais permet l'utilisation des échantillons pour la microscopie à fluorescence. Il a tendance à durcir les tissus. Cette solution doit être préparée et utilisée rapidement, car elle risque de perdre en efficacité.

La réaction du paraformaldéhyde sur le tissu est la suivante (Fig.29) :

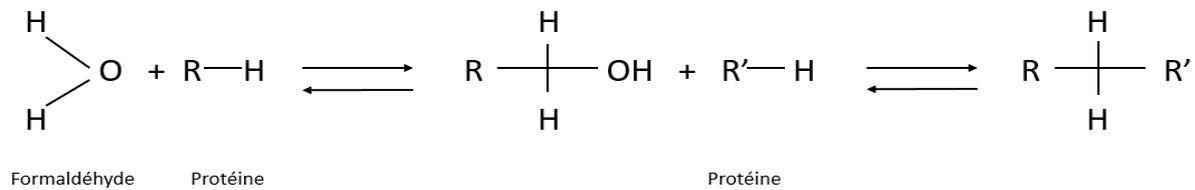


Figure 29 Réaction entre le formaldéhyde et la protéine

Le liquide de Bouin se compose d'acide picrique 75% et au formaldéhyde 7,2% dans de l'eau distillée. C'est un fixateur coagulant, l'acide picrique provoque une dénaturation et précipitation des protéines.

Le fixateur au Bouin (Fig.30) préserve les caractéristiques morphologiques telles que le noyau et le tissu conjonctif. Par contre, il provoque une fluorescence tissulaire et dégrade rapidement les acides nucléiques mais ne durcit pas les tissus (Venteo et Velot, 2010).



Figure 30 Bras de *Asterias rubens* dans une solution de Bouin

3.5 La microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage a permis d'observer le tégument des étoiles de mer *A. rubens* et *A. gibbosa* ainsi que les structures externes associées. L'étoile *A. gibbosa* a été fixée et conservée dans de l'éthanol 70% et était une petite adulte de 4 cm de diamètre. Pour *A. rubens*, ce sont des fragments d'étoile fixés et conservés dans de l'éthanol 70% qui ont été utilisés.

La microscopie électronique à balayage permet l'observation d'échantillons microscopiques (avec une résolution de 0,4 à 20 nanomètres suivant les modèles).

Le schéma ci-contre (Fig.31) montre le fonctionnement du microscope électronique à balayage.

Le canon à électrons produit un faisceau d'électrons condensés via des condensateurs. Lorsque le faisceau d'électrons percute l'échantillon, certains électrons rebondissent : ils sont dits « électrons secondaires ». Ceux-ci produisent une très faible énergie suite au bombardement de l'échantillon. Le microscope balaie ainsi l'échantillon.

Ces électrons secondaires sont amplifiés et détectés pour ensuite être convertis en signal électrique. L'ensemble des signaux reçus permet de reconstruire la typographie de l'échantillon. On obtient une image en relief et en noir et blanc (Goldstein 2003).

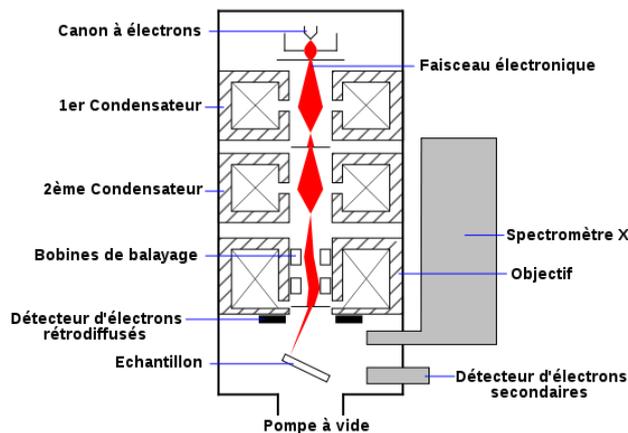


Figure 31 Schéma de microscope électronique à balayage, avec en rouge, le faisceau d'électrons. Source

28

- Préparation des échantillons

Les échantillons utilisés sont des fragments d'étoile de 1 cm de long sur 0,5 cm de larges fixés au paraformaldéhyde (voir 3.5).

Ils doivent ensuite être séchés. En effet, la pression dans la chambre d'observation du microscope étant très basse, les molécules d'eau ou d'éthanol contenues dans l'échantillon risqueraient de l'endommager en s'évaporant.

Les échantillons sont séchés grâce à la méthode du passage au point critique du dioxyde de carbone à l'aide d'une chambre augmentant la pression (Fig.32).

²⁸<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=668987>

Le séchage par le passage du point critique du dioxyde de carbone permet de garder l'échantillon structurellement intact en contournant le passage liquide-gazeux. Sous haute pression et sous haute température, le dioxyde de carbone empruntera une forme supercritique, phase intermédiaire entre les phases gazeuses et liquides. Le dioxyde de carbone est utilisé pour son point critique facilement atteignable : 73 bars et 31°C.

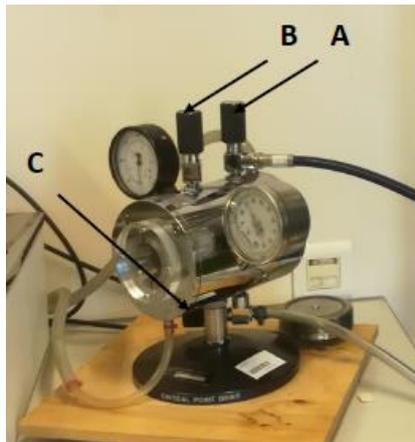


Figure 32 Chambre à pression.

Les échantillons sont placés dans des supports recouverts d'un grillage afin d'être introduits dans la chambre à pression remplie d'éthanol 100%.

Cette chambre à pression est reliée à une bonbonne de dioxyde de carbone liquide. En ouvrant la bonbonne et la vanne A, (Fig.32A), l'éthanol présent dans les échantillons est remplacé par du dioxyde de carbone liquide. L'éthanol remplacé est évacué à l'aide de la vanne C (Fig.32C). Cette étape est répétée jusqu'au remplacement total de l'éthanol présent dans l'échantillon.

Une fois tout l'éthanol éliminé, la pression de la chambre est éliminée via la vanne B (Fig.32B). La pression et la température sont augmentées respectivement à 80 atm et 39°C. Une fois ces valeurs atteintes, la pression est diminuée jusqu'à 0 afin de contourner le point critique.

L'échantillon est déshydraté.

- Métallisation

Les échantillons ont été métallisé avec un métalliseur Jeol JFC – 1100E. Les échantillons organiques étant faiblement conducteurs, les électrons secondaires risquent d'être trop rares pour produire une image de bonne qualité.

Pour contrer ce problème, une métallisation est nécessaire. Les échantillons, une fois séchés sont posés sur un support (Fig.33). Ils sont ensuite recouverts d'une mince couche d'or par pulvérisation cathodique.

Cette technique consiste à déposer sur l'échantillon des atomes arrachés à un morceau de métal par l'argon ionisé. Ceci se passe dans une enceinte à vide partiel.



Figure 33 Echantillons sur les supports pour la métallisation (stubs)

Finalement, les échantillons ont été observés au microscope électronique à balayage JEOL JSM – 7200F.

3.6 Décalcification des tissus

A la sortie du fixateur les échantillons sont décalcifiés dans une solution de Morse (20% d'acide formique et 10% de citrate de sodium dans de l'eau milli-Q®). Suivant la taille de l'échantillon, la durée de la décalcification varie entre 7h et 12h. Cette solution est à conserver au frigo. La solution de Morse doit être changée toutes les 2 à 3 heures afin de garantir son efficacité. Les échantillons sont ensuite rincés dans des bains d'éthanol. L'échantillon est enfin placé dans deux bains d'éthanol de degré croissant.

La décalcification permet de dissoudre l'endosquelette calcaire de l'étoile. Si l'endosquelette est encore présent, cela risque d'abîmer la lame du microtome et de rendre les coupes de l'échantillon inutilisables.

3.7 Enrobage en paraffine et réalisation de coupes histologiques

Après la décalcification, les échantillons sont déshydratés dans des bains d'éthanol de degrés croissants : 30 minutes dans le l'éthanol à 90% et trois bains de 30 minutes dans de l'éthanol à 100%, en changeant l'éthanol entre chaque bain (Fig.34).

La paraffine étant hydrophobe, les étapes de déshydratation sont obligatoires afin d'avoir une bonne inclusion de l'échantillon. Il est nécessaire de solidifier les tissus avant de réaliser des coupes au microtome.

Pour ce faire, on réalise une inclusion des tissus déshydratés dans des blocs de paraffine. L'inclusion consiste à figer l'échantillon en remplaçant progressivement l'éthanol contenu dans le tissu par de la paraffine, cette dernière étant solide tout en restant facile à couper en fines tranches pour analyse.



Figure 34 *Asterina gibbosa* après fixation au PAF, décalcification et déshydratation

Un rinçage au toluène de l'échantillon permet l'élimination de l'éthanol et assurera une bonne pénétration de la paraffine au sein des tissus : un premier bain de 5 minutes et un second de 8 minutes.

L'échantillon est placé dans une cuvette en porcelaine et recouvert de paraffine. La paraffine va pénétrer l'échantillon. Cette cuvette en porcelaine contenant l'échantillon est placée ensuite dans une étuve à 60°C.

La paraffine est changée 3 fois, toutes les heures, afin d'éliminer le toluène présent dans l'échantillon. Le dernier bain de paraffine est laissé toute une nuit. L'échantillon est ensuite placé au centre d'une cuvette en métal et recouvert de paraffine neuve préalablement chauffée à 60°C.

Une fois la paraffine refroidie, le bloc est démoulé. Ce bloc de paraffine est ensuite collé sur un support en bois (Fig.35), afin de pouvoir le fixer au microtome Microm HM 340 E (Fig.36) pour effectuer les coupes.



Figure 35 Bloc de paraffine fixé sur le support en bois.

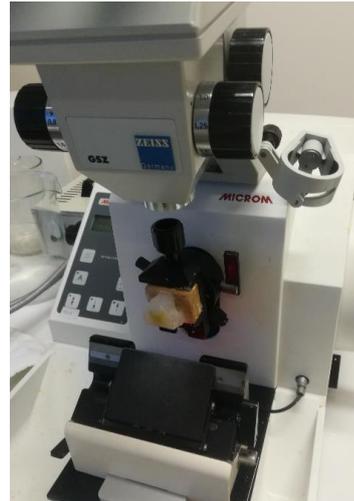


Figure 36 Microm HM 340 E avec bloc de paraffine fixé.

Les coupes réalisées sont de l'ordre de 7 μm . Les coupes sont ensuite déposées sur des lames, sur lesquelles se trouve une goutte d'eau. Une lame de verre pour les colorations topographiques ou une lame histologique pour les immunodétections, est ensuite placée sur une plaque chauffante réglée sur 40-45°C. La température de fusion de la paraffine étant comprise entre 50 et 57°C, cela va ramollir la coupe et permettre un meilleur étalement et une adhérence de celle-ci sur la lame après séchage de la goutte d'eau.

3.8 Colorations topographiques au trichrome de Masson

La coloration au trichrome de Masson permet de mettre en évidence les fibres de collagène, colorées en vert-bleu, les noyaux des cellules en bleu-violet, et les tissus musculaires, colorés en rose, dans des coupes histologiques.

Le principe de la coloration est simple : les colorants sont des sels, composés d'ions positifs ou d'ions négatifs. Ils se lient aux cellules/organites cellulaires par interaction ionique (O'Dowd et al, 2015).

Trois colorants principaux composent le Trichrome : l'hématoxyline de Groat, la Fuschine- Ponceau et le vert lumière.

L'hématoxyline est un colorant nucléaire basique qui va colorer les noyaux en bleu-violet.

La fuchsine est un colorant acide obtenu après l'oxydation de la fuchsine basique avec de l'oxyde de soufre et qui va colorer le cytoplasme en rose.

Le vert lumière et un contre-colorant acide de la fuchsine, il va colorer les tissus conjonctifs en bleu-vert.

Un autre colorant rentre dans la méthodologie du Trichrome de Masson : l'orange G molybdique. C'est un colorant secondaire qui permet d'intensifier la coloration des tissus conjonctifs.

Avant la coloration les coupes ont été déparaffinées dans deux bains de toluène successifs, de 10 minutes chacun. Après déparaffinage, les coupes ont été immergées dans des bains d'éthanol de concentration décroissante. Elles ont ensuite été rincées à l'eau courante durant 15 minutes. Les coupes ont été plongées 3 minutes dans l'hématoxyline de Grocott et rincées 15 minutes dans de l'eau de ville courante afin d'intensifier la coloration nucléaire.

Les coupes ont ensuite été immergées 5 minutes dans un second colorant, la Fuschine- Ponceau. Ensuite, les coupes sont passées dans de l'acide acétique 1% qui fait office de mordant. Afin d'intensifier la coloration des tissus conjonctifs, elles sont plongées 5 minutes dans l'orange G molybdique. Après un second passage dans de l'acide acétique, elles sont plongées 5 minutes dans le dernier colorant, le vert de lumière pour terminer par un dernier bain dans l'acide acétique 1%.

La coloration est suivie d'une déshydratation dans deux bains d'éthanol de concentration croissantes. Deux bains de toluène sont ensuite effectués afin d'éliminer l'éthanol et de faciliter l'application de la résine synthétique Roti Histokit II. Après l'application de la résine, les lames sont recouvertes d'une lamelle de verre et séchées durant 24h. Enfin, les lames sont luttées à l'aide d'un vernis.

Les lames sont observées à l'aide d'un microscope Zeiss AxioScope A1 couplé à une caméra AxioCam ICc3 qui permet des prises de vue.

3.9 Colorations immunohistochimiques

La coloration immunohistochimique permet de mettre en évidence certaines protéines recherchées via des réactions anticorps-antigène.

La méthode utilisée ici est dite la méthode indirecte : un anticorps primaire se fixe sur la protéine d'intérêt, ensuite un anticorps secondaire lié à une peroxydase vient s'y attacher.

Les anticorps sont ensuite révélés grâce à la DAB ou 3,3'-diaminobenzidine qui s'oxyde en présence de peroxydase. L'oxydation de la DAB forme un précipité marron.

Trois types d'anticorps primaires ont été utilisés :

- Anticorps anti- α -tubuline acétylée, utilisée à concentration 1 pour 2000
- Anti-sérotonine, utilisée à concentration 1 pour 3000
- Anticorps « luciférase d'ophiure », utilisée à concentration 1 pour 3000

Les anticorps secondaires utilisés dépendent de l'hôte de l'anticorps primaire :

- Anti-souris pour l'anti- α -tubuline acétylée
- Anti-lapin pour l'anti-sérotonine et l'anticorps « luciférase d'ophiure »

Pour chaque type d'anticorps testé, un contrôle négatif a été effectué.

L'immunohistochimie est réalisée à partir des coupes paraffinées obtenues précédemment.

La première étape consiste à la préparation de la lame. Celles-ci sont déparaffinées dans 3 bain de 30 minutes de toluène. Ensuite, deux bains d'éthanol 100%. Par après les coupes sont placées dans un bain de méthanol avec 1% de peroxyde d'hydrogène durant 30 minutes afin d'inhiber la peroxydase. Une inhibition de la peroxydase endogène des tissus est nécessaire afin d'éviter des faux positifs.

Les coupes sont ensuite rincées dans des solutions d'éthanol de degrés décroissants puis dans de l'eau distillée, du PBS²⁹ et du PBST³⁰ durant 10 minutes.

Les lames sont délicatement essuyées et les coupes sont entourées à l'aide d'un marqueur hydrophobe. Une goutte d'albumine de sérum bovin dilué dans du PBST est déposée sur chaque coupe. Les coupes sont ensuite incubées 2h dans une chambre humide à température ambiante. L'albumine de sérum bovin permet de bloquer les sites de marquages aspécifiques en se fixant sur les sites de marquages spécifiques et aspécifiques et ainsi d'éviter les faux positifs. L'anticorps utilisé ayant une affinité plus grande sur les sites de marquage spécifiques, il déplace l'albumine de sérum bovin afin de s'y fixer.

²⁹ Tampon phosphate salin

³⁰ PBST : tampon phosphate salin dans lequel il y a du Tween1%.

Les lames sont égouttées et l'anticorps primaire dilué dans de l'albumine de sérum bovin est déposé sur celles-ci. Les lames sont maintenues à 4°C une nuit dans une chambre humide.

Les anticorps primaires vont se lier à la protéine recherchée (Fig.37).

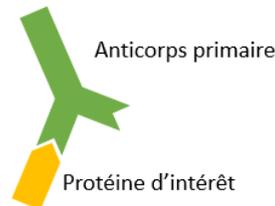


Figure 37 Schéma représentant la fixation de l'anticorps primaire sur la protéine d'intérêt.

Le lendemain, les lames sont égouttées et l'anticorps secondaire dilué dans de l'albumine de sérum bovin est déposé sur celles-ci.

Les lames sont maintenues à température ambiante dans une chambre humide durant 3h. L'anticorps secondaire va se lier à l'anticorps primaire (Fig.38).

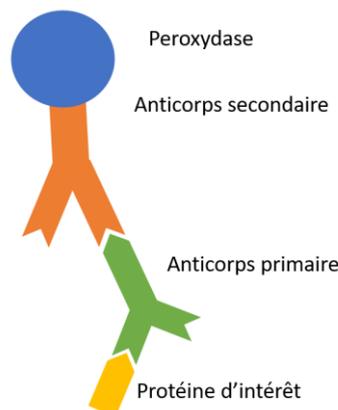


Figure 38 Schéma représentant la fixation de l'anticorps secondaire sur l'anticorps primaire.

Et enfin, la révélation à l'aide de la DAB ou 3,3'-diaminobenzidine. La DAB va s'oxyder et former un précipité brun (Fig.39). La réaction est chronométrée (voir annexe pour les temps de révélation) est arrêtée lorsque le contraste est maximal en plongeant la lame dans de l'eau distillée.

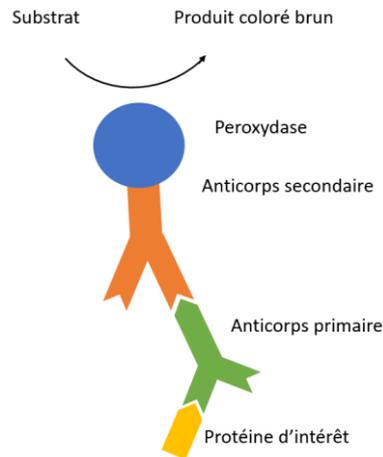


Figure 39 Schéma représentant la réaction immunohistochimique sur une protéine.

Après la révélation, il y a une contre-coloration à l'hémalum de Mayer, plusieurs rinçages à l'eau distillée et une autre contre-coloration au bleu de Luxol. Les lames sont ensuite déshydratées dans des bains d'alcool de degrés croissant pour terminer par deux bains de xylènes. Les zones ciblées par les anticorps primaires et secondaires sont donc brunes tandis que les zones non marquées sont bleues.

Les lames sont enfin montées à l'aide de la résine synthétique Roti Histokit II et observées, après lutage, au microscope Zeiss AxioScope A1 couplé à une caméra AxioCam ICc3.

4 Résultats

4.1 Morphologie générale des espèces étudiées

Les mesures citées sont spécifiques aux spécimens étudiés et non généralisables à l'espèce.

a. *Asterina gibbosa*

Les spécimens adultes étudiés présentent des bras d'une longueur d'environ 10 mm pour un diamètre total d'environ 25mm.

Sur la face aborale, l'espèce est généralement de couleur unie sable parsemée par de taches plus foncées. Le tégument de l'animal est recouvert de piquants d'environ 0,2 mm subdivisés en deux ou trois.

Une rangée de piquants est également présente sur les contours de l'étoile bien qu'un peu plus longs, 0,25mm, et regroupés par quatre. On retrouve également sur la face aborale la plaque madréporite calcaire. Celle-ci mesure environ 1mm de diamètre, elle est recouverte de sillons et protégée par des piquants (Fig.40.A, 40B).

Des podia terminaux (autrement appelées tentacules terminaux) sont présents à l'extrémité de chacun des 5 bras, (Fig.40C). Un ocelle rouge d'environ 0,20 mm est aussi visible (Fig.40C). Les piquants sont de la même taille que ceux sur la face aborale et sont quant à eux regroupés par deux (Fig.40D).

Sur la face orale, la coloration de l'étoile apparaît beaucoup plus claire. Le tégument ventral de l'animal possède plusieurs rangées symétriques de piquants de 2mm, par groupe de deux. Le sillon ambulacraire mesure environ 1,5 mm de large et présente deux rangées de podia (Fig.40E) mesurant en moyenne 2,5 mm.

La bouche mesure approximativement 2,5 mm au repos et se situe au centre de la face orale. Elle est protégée par des piquants de 1,25 mm (Fig.40F,40G).

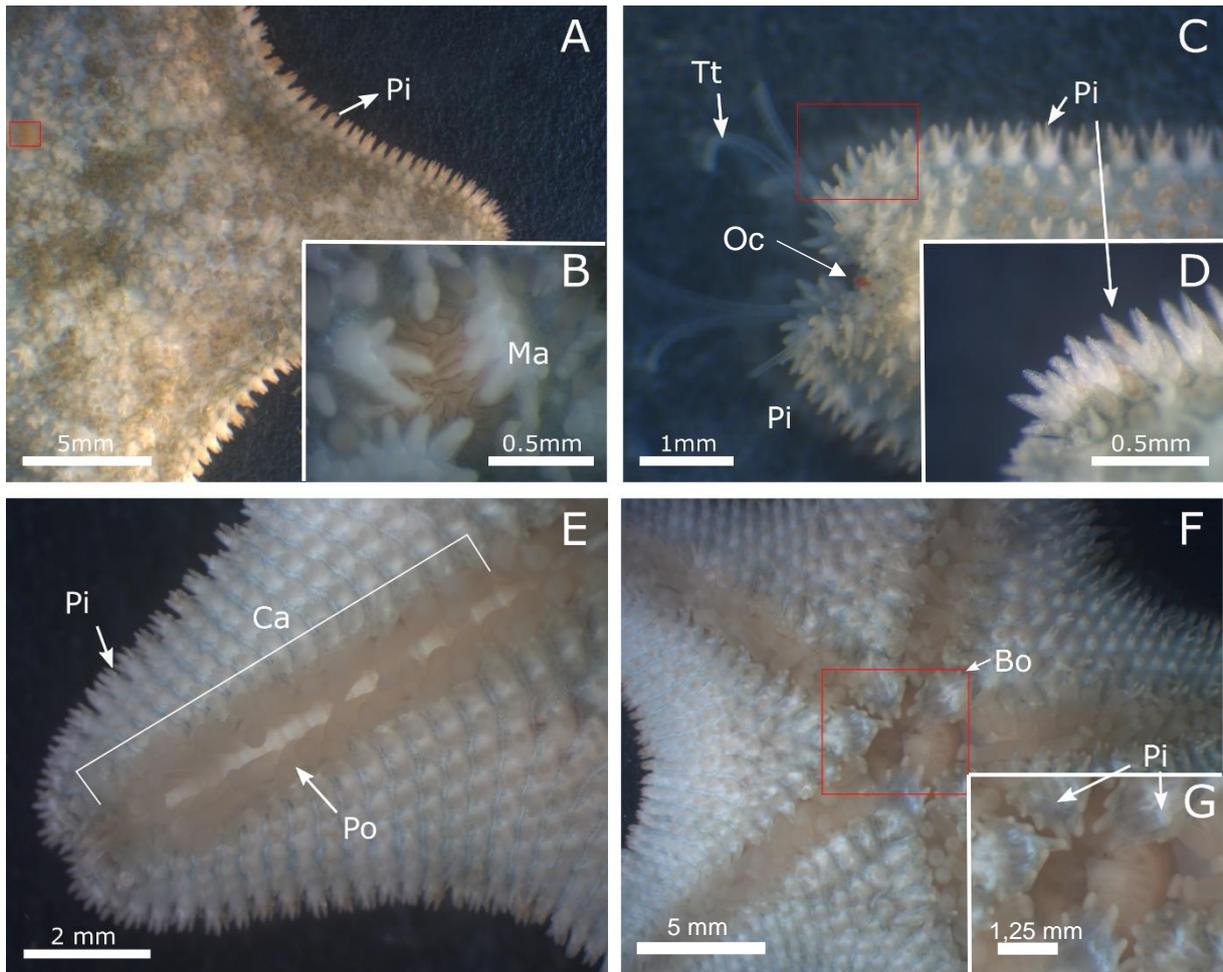


Figure 40 Observations au binoculaire de *Asterina gibbosa*. A : face aborale de l'étoile de mer. B : détail de la plaque madreporite. C : face aborale, extrémité du bras. Ocelle visible. D : détails des piquants latéraux. E, F : face orale de l'étoile de mer.
 Légende ; Bo : bouche, Ca : canal ou sillon ambulacraire, Ma : madreporite, Oc : ocelle, Pi : piquant, Po : podia, Tt : tentacule terminal.

b. Asterias rubens

La face aborale est de couleur rouge avec des taches de couleur sable. Le tégument de la face aborale est très rugueux, composé de rangées de piquants d'environ 1,25mm (Fig.41A). La longueur d'un bras est de 25 mm. La longueur de l'étoile, de l'extrémité d'un bras à l'extrémité d'un autre bras est de 58 mm. Une rangée de piquants de 1,60 mm est présente sur les contours de l'étoile (Fig.41A). Ceux-ci rétrécissent jusqu'à atteindre 0,8 mm à l'extrémité du bras (Fig.41C).

À l'extrémité des bras se situe un ocelle. Il mesure 0,3 mm (Fig.41D).

La plaque madréporite de diamètre de 2mm est située au niveau de l'intersection de deux bras (Fig.41A,41B). Elle a un aspect gélatineux avec de nombreux sillons.

Des papules sont discernables sur la surface aborale (Fig.41E).

Sur la face orale, les canaux ambulacraires larges de 6mm occupent presque toute la largeur des bras. L'étoile possède 4 rangées de podia de 5 mm de long (Fig.41F).

Les canaux ambulacraires sont protégés de part et d'autre par de longs piquants de 1,60 mm (Fig.41F).

La bouche est visible et mesure 9 mm de diamètre (Fig.41G). 4 piquants de 2mm de long, à l'intersection de chaque bras, la protègent des agressions extérieures (Fig.41G).

Lors de l'anesthésie d'une étoile, les muscles présents dans la paroi de l'estomac cardiaque se relâchent celui-ci peut se dévagner et être observé (Fig.41F).

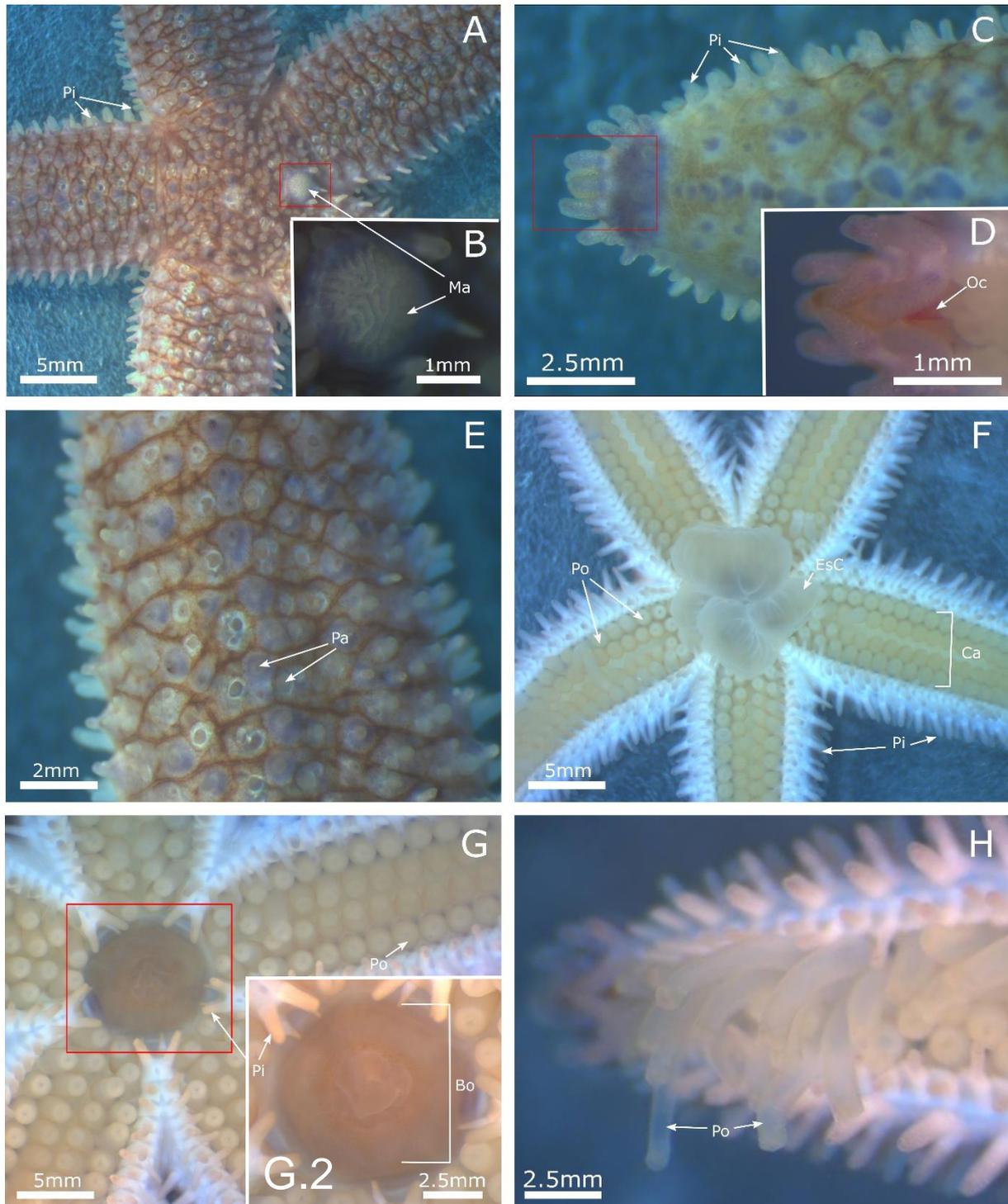


Figure 41 Observations au binoculaire de : *Asterias rubens*. A : face aborale, avec la plaque madreporite visible. B : zoom sur la plaque madreporite. C : face aborale ,extrémité du bras. D : zoom sur l'extrémité du bras. E : face aborale du bras. F : face orale, avec l'estomac cardiaque. Légende : Bo : bouche. Ca : canal ou sillon ambulacraire. Ma : madreporite. Oc : ocelle. Pa : papule. Pi : piquant. Po : podia. Tt : tentacule terminal.

4.2 Morphologie fine des espèces étudiées

4.2.1 Etude morphologique au microscope électronique à balayage

a. *Asterina gibbosa*

Le spécimen étudié ici fait 3cm de diamètre.

Outre les piquants de la face aborale présents par bouquets de 3 ou 4 (Fig.42A) et ceux bordant l'étoile de mer (Fig.42B) déjà relevés durant les observations à la loupe binoculaire, *A. gibbosa* présente des perforations de 0.15mm de diamètre (Fig.42F). Ces perforations permettent aux papules de se rétracter dans le tégument (Fig.42A). Les papules décontractées sont plissées (Fig.42E).

Sur la face orale, le canal ou sillon ambulacraire est large de 1 mm (Fig.42C). Il est garni de podia possédant un disque terminal d'un diamètre de 0,4 mm (Fig.42D). Le corps du podion est plissé (Fig.42D). Il est difficile d'estimer le nombre de rangée de podia dû au mauvais état de l'échantillon. Des rangées de piquants de 0,2 mm parallèles à celui-ci le protègent des agressions extérieures (Fig.42C).

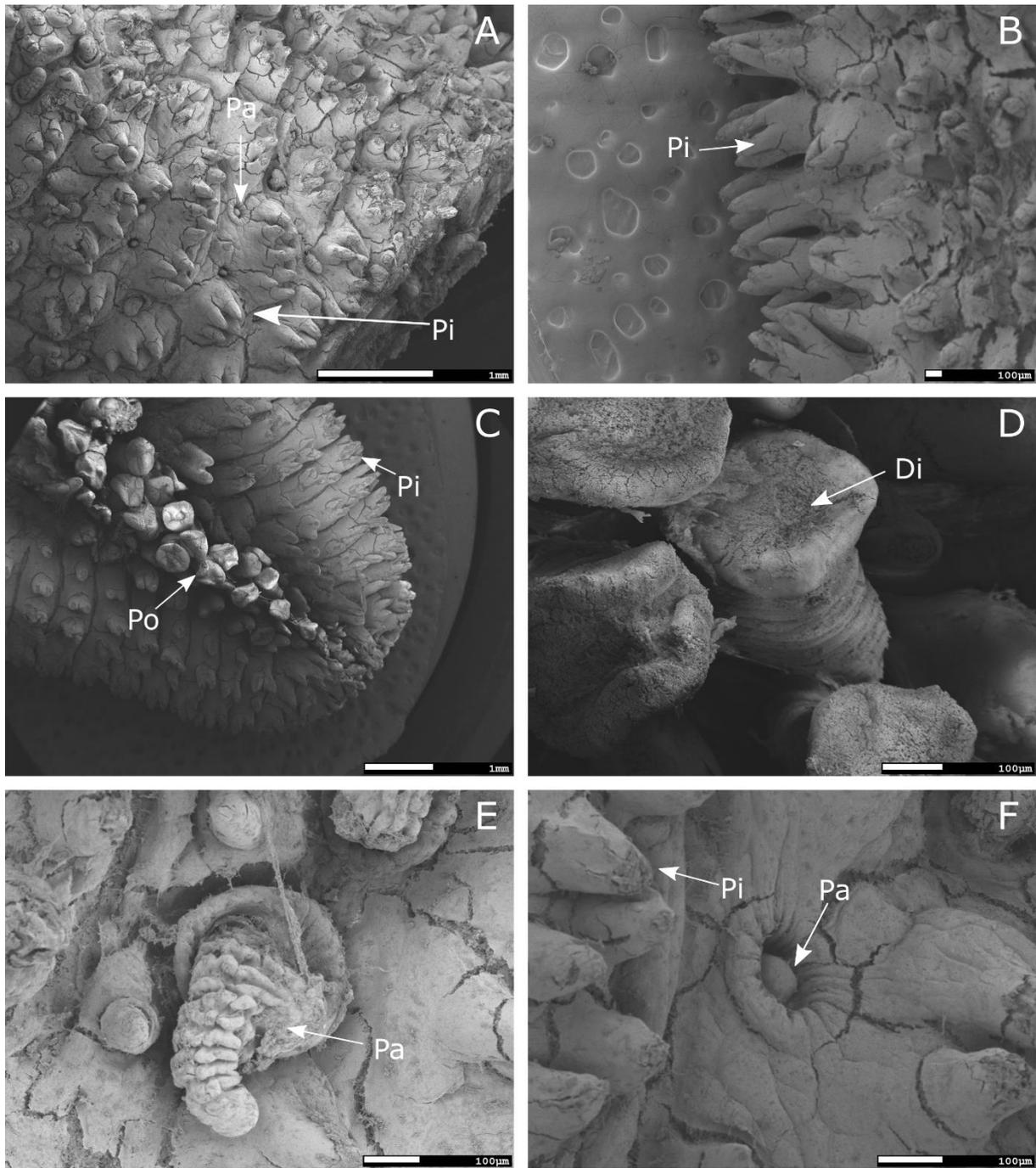


Figure 42 Observations au microscope électronique à balayage de *Asterina gibbosa*. A : Face aborale du disque de l'étoile. B : vue de la tranche du bras de l'étoile. C : face orale du bras de l'étoile. D : Podia. E : face aborale du disque de l'étoile. F : face aborale du disque de l'étoile.
Légende : Di : disque terminal du podion. Pa : papule. Pi : piquant.

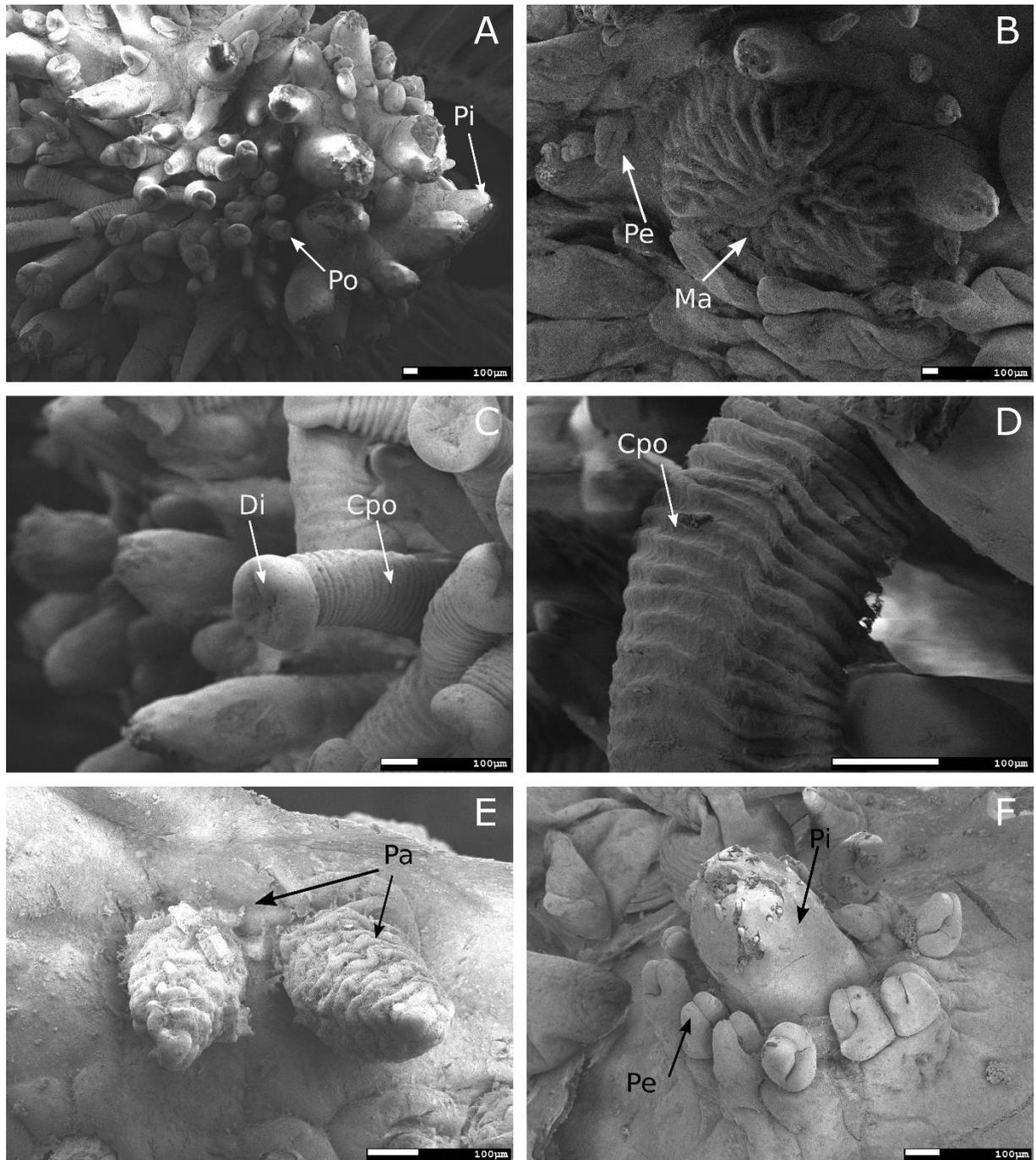


Figure 43 Observations au microscope électronique à balayage de *Asterias rubens*. A : extrémité du bras en face orale. B : face aborale du disque de l'étoile, zoom sur la plaque madreporite. C : face orale, vue sur les podias. D : face orale, zoom sur le corps du podia. E : face aborale, papules. F : face aborale, piquants avec pédicellaire
 Légende : Po : podia. Pi : piquant. Pe : pédicellaire. Ma : plaque madreporite. Di : disque du podia. Cpo : corps du podia. Pa : papules

4.2.2 Etude histologique et immunohistochimique

Les résultats suivants sont destinés à être lus à l'aide de l'annexe 22 déplié.

Le liquide de Bouin est le fixateur pour les coupes suivantes, le paraformaldéhyde ne donnant pas de résultats concluants avec les anticorps testés.

Les mesures données sont spécifiques aux coupes présentes dans ce travail. Les annexes permettent de savoir précisément où ces mesures ont été effectuées.

La DAB (3,3'-diaminobenzidine) permet de mettre en évidence, via une coloration brune les microtubules contenant de la tubuline présente dans les axones des cellules nerveuses.

Le trichrome de Masson permet de différencier les tissus conjonctifs qui apparaissent bleu-vert des tissus musculaires et cellulaires qui apparaissent en rose.

4.2.2.1 *Asterina gibbosa*

a. Anticorps anti- α -tubuline acétylée sur *Asterina gibbosa* : coupes transversales

Le nerf radiaire possède une cuticule large de 30 μm et marque une coloration brune au DAB épaisse de 44 μm (Fig.44A). La coloration brune est uniforme au sein du cordon nerveux, les cellules ne sont pas différenciables. Au trichrome de Masson, la cuticule apparaît bleue, signe de tissus conjonctifs tandis que les plexus hyponeuraux et ectoneuraux apparaissent en rose (Fig.44B).

Les nerfs marginaux marquent un plexus nerveux épais de 19,4 μm et possèdent une cuticule de 13,7 μm (Fig.45F). Les nerfs marginaux rejoignent le nerf radiaire à l'extrémité du bras (Fig.44C).

Les podia présentent un plexus basiépithélial épais de 5,7 μm , qui longe leur épiderme (Fig.45E, F).

L'ocelle terminal est majoritairement rose au trichrome de Masson. Les cellules de l'épithélium externe et interne apparaissent plus foncées (Fig.44E, F). Mais elle présente un fin tissu conjonctif vert (Fig.44F) qui longe un fin plexus nerveux marron à la DAB épais de 8,2 μm (Fig.44D).

Au niveau de l'épithélium externe, le plexus nerveux basiépithélial est mis en évidence par la DAB et est épais de 2,4 μm avec un épaissement de 6,3 μm entre les piquants et donc entre chaque ossicule (Fig.44G, H ;45A). L'épiderme est d'un bleu plus clair que le derme (Fig.44C, D).

La cuticule apparaît rose très foncé au trichrome de Masson et l'épiderme un peu plus clair (Fig.45C, D).

La coloration au trichrome de Masson permet de voir que les bras sont principalement composés de fibres et de tissus conjonctifs ainsi que de lacunes (Fig.44B). Les lacunes correspondent à l'emplacement des ossicules.

Sur la face aborale, au niveau de la cavité générale, une fine membrane de 6,1 μm marquée de brun longe l'épithélium cœlomique avec un épaissement nerveux de 19,1 μm . Cet épaissement nerveux correspond à un muscle apical (Fig.45H).

Au centre de la cavité générale se trouve l'estomac cardiaque. L'épithélium viscéral de l'estomac cardiaque large de 69,2 μm , est très fortement marqué par la DAB : un fin plexus basiépithélial épais de 15,9 μm le borde (Fig.46A, B, C).

L'estomac cardiaque ne marque qu'une coloration rosée au trichrome de Masson (Fig.46D).

La plaque madréporite d'une longueur de 442 μm et d'une largeur de 280,7 μm ne marque pas de coloration brune pour l'immunohistochimie à part du bruit de fond³¹ (Fig.46E). Mais celle-ci marque une légère coloration rosée au trichrome de Masson (Fig.46G).

Les papules sont légèrement marquées par la DAB (Fig.45G ;46F).

³¹ interférences dues au temps de révélation trop long.

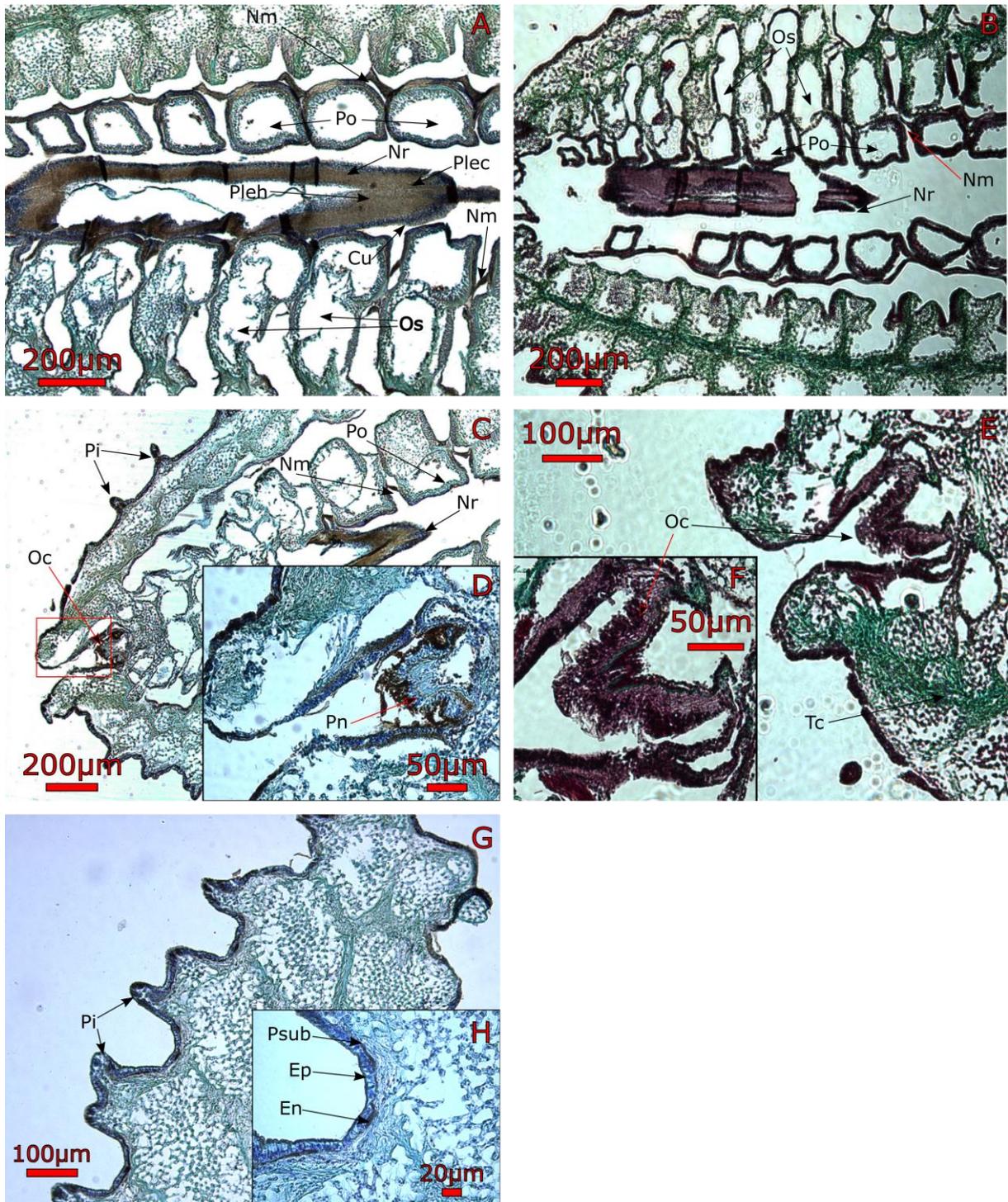


Figure 44 Coupes de *Asterina gibbosa*. Colonne de gauche : coloration immunohistochimique à la DAB avec de l'anti- α -tubuline acétylées. Colonne de droite : trichrome de Masson A : Canal ou sillon ambulacraire. B : Canal ou sillon ambulacraire. C : Extrémité du bras. E : extrémité du bras. G : Extrémité du bras.

Légende : Cu : cuticule. En : épaissement nerveux. Ep : épiderme. Nm : nerf marginal. Nr : nerf radiaire. Oc : ocelle. Os : ossicule. Psub: plexus basiépithélial du tégument. Pi : piquant. Plec : plexus ectoneural. Pleh : plexus hyponeural. Tc : tissus conjonctifs.

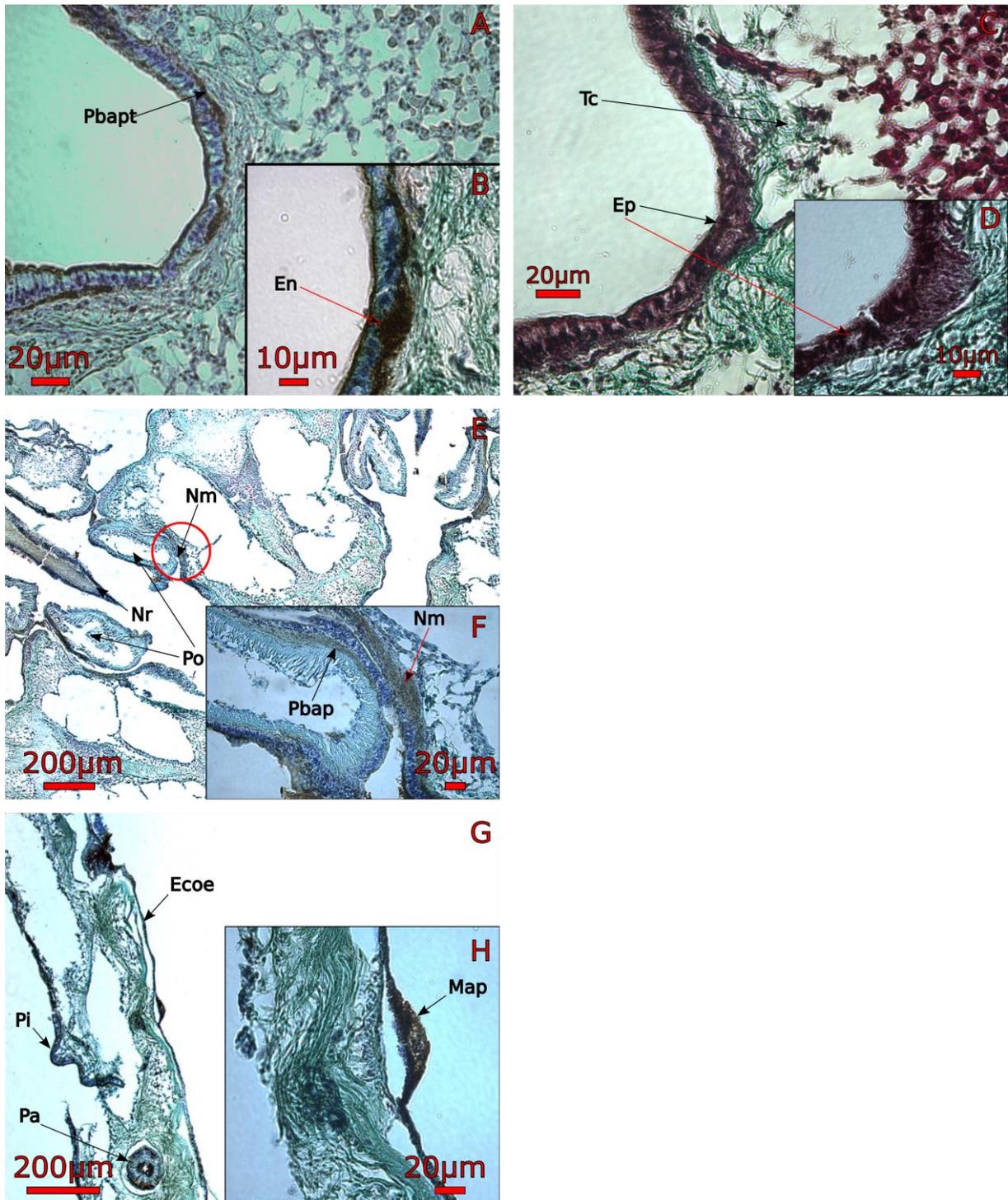


Figure 45 Coupes de *Asterina gibbosa*. Colonne de gauche: coloration immunohistochimique à la DAB avec de l'anti- α -tubuline acétylée. Colonne de droite: Trichrome de Masson. A : espace entre les piquants. B : espace entre les piquants. E: sillon ambulacraire. G : zoom sur l'épiderme, avec vers l'intérieur la cavité coelomique
 Légende : Ecoe : épithélium coelomique. Map : Muscle apical. Ep : épiderme. Nm : nerf marginal. Nr : nerf radiaire. Pa : papule. Pbap : plexus basiépithélial du podium. Pbapt : plexus basiépithélial du tégument. Pi : piquant.. Tc : tissu conjonctifs.

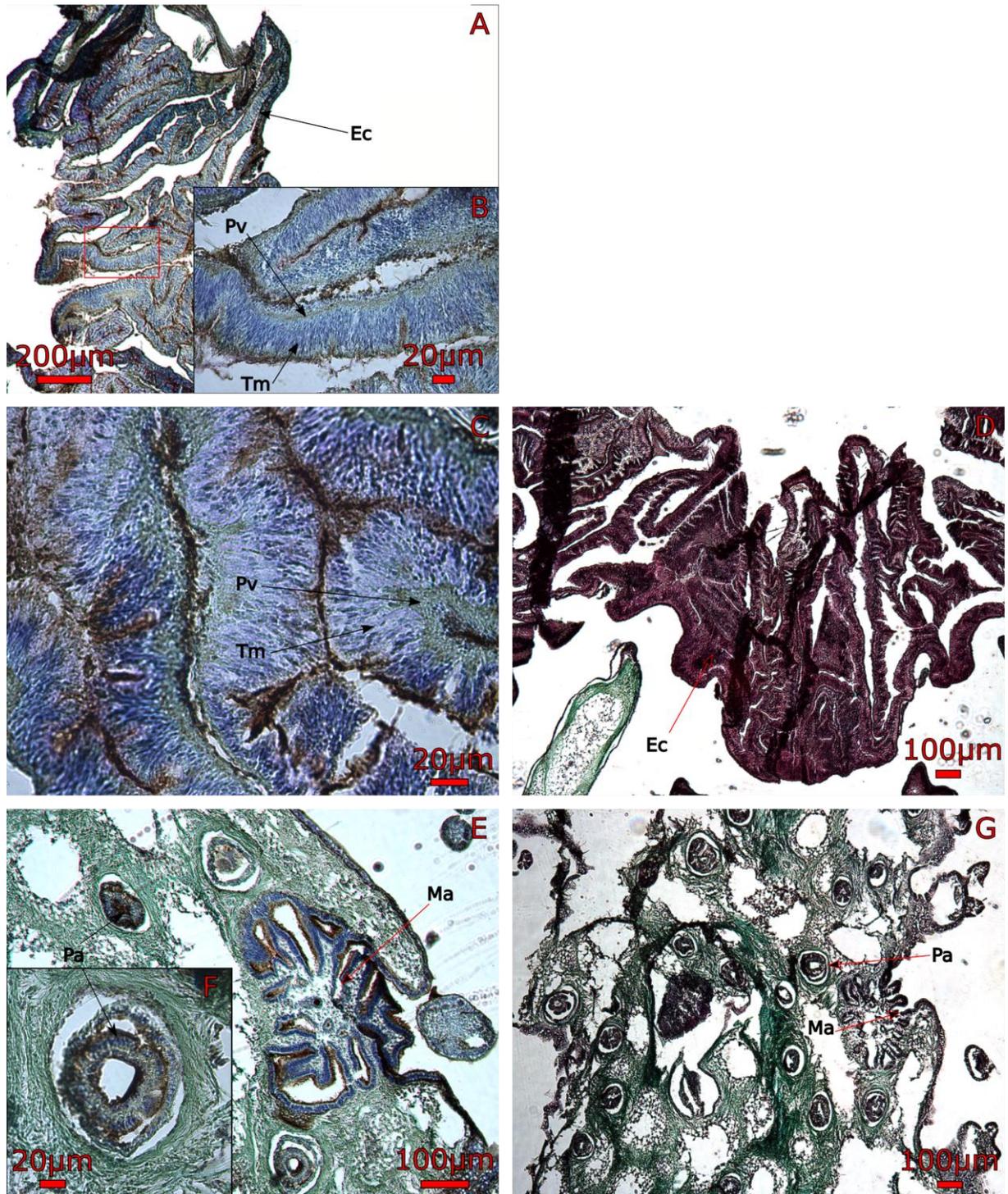


Figure 46 Coupes de *Asterina gibbosa*. Colonne de gauche: coloration immunohistochimique à la DAB avec de l'anti- α -tubuline acétylée. Colonne de droite: Trichrome de Masson. A : estomac cardiaque. C : zoom de l'estomac cardiaque. D : estomac cardiaque. E : Ma. F : papule. G : surface de la face aborale de l'étoile.
 Légende : Ec : estomac cardiaque. Ma : madreporite. Pa : papule. Pv : plexus viscéral. Tm : tissus mucosal.

b. Anticorps anti- α -tubuline acétylée sur *Asterina gibbosa* : coupes longitudinales

Sur la coupe de l'immunohistochimie au DAB, de l'extérieur au lumen, l'épiderme du podion est bleu foncé. Le plexus basiépithélial épais de 6,8 μm marque une coloration brune. Vient ensuite une fine couche de 3,7 μm de tissus conjonctifs bleu ciel. Enfin, juste avant le lumen vient le muscle rétracteur du podion épais de 34,2 μm . A la base du disque du podion, le plexus basiépithélial s'épaissit pour former le ganglion nerveux du podion. Ce ganglion est large de 29,9 μm (Fig.47A, B).

Le corps du podion est principalement constitué de tissus cellulaires et musculieux, comme l'indique la coloration rosée au trichrome de Masson (Fig.47C). La coloration rose très foncé de l'épiderme indique que celui-ci est composé de nombreux corps cellulaires. Après l'épiderme, le plexus basiépithélial marque une coloration rose légèrement plus clair. Vient ensuite un tissu conjonctif coloré en bleu-vert. Après le tissu conjonctif, les muscles rétracteurs sont roses et fibreux.

Il y a le même type d'épaississement nerveux entre les piquants que sur les coupes transversales, celui-ci étant épais de 10,8 μm . (Fig.47D, E). Le plexus nerveux sous-épithélial est continu dans les piquants. Au trichrome de Masson, le corps de l'étoile apparaît cyan avec des lacunes tandis que l'épiderme et la cuticule apparaissent en rose (Fig.47F, G).

Dans la cavité générale, l'estomac cardiaque est relié à l'épithélium coelomique par un fin mésentère de 10,7 μm d'épaisseur qui ne présente aucun marquage brun (Fig.48A). L'estomac cardiaque présente de nombreux replis (Fig.48B, C, H) et son épiderme est épais de 104,2 μm . Il est composé de plusieurs couches cellulaires marquées différemment par la DAB : la couche la plus interne (vers le lumen) est épaisse de 12,2 μm , bleue tirant vers le mauve et les cellules ont un aspect fibreux. Ensuite, vient une couche bleu foncé épaisse de 28,3 μm et composée de noyaux de cellules. Vient ensuite une autre couche fibreuse bleue et épaisse de 27,4 μm qui borde le plexus nerveux viscéral. Le plexus viscéral est brun très clair et diffus. Il est épais de 10,5 μm . Il y a ensuite une couche de fibres musculaires épaisse de 5,7 μm et enfin l'épithélium coelomique épais de 6,8 μm composé de cellules ciliées, marquées en bleu foncé (Fig.48, I).

Les caeca rectaux sont disposés au-dessus de l'estomac pylorique (Fig.48D). Un artefact (Fig.48F, G) est logé dans un creux triangulaire de l'épithélium cœlomique de l'estomac pylorique. Il se situe entre les caeca rectaux, disposés au-dessus de l'estomac et l'estomac pylorique lui-même (Fig.48D).

Le plexus nerveux viscéral suit parallèlement ce creux, au niveau de l'épithélium cœlomique (Fig.48F, G).

Il n'y a pas de marquage particulier au niveau des caeca rectaux (Fig.48D). Des observations à plus fort grossissement sont envisageables.

L'estomac pylorique marque une légère coloration brune (Fig.48D) L'estomac cardiaque, juste sous l'estomac pylorique, est marqué plus intensément par la DAB (Fig.48E) que ce dernier (Fig.48D).

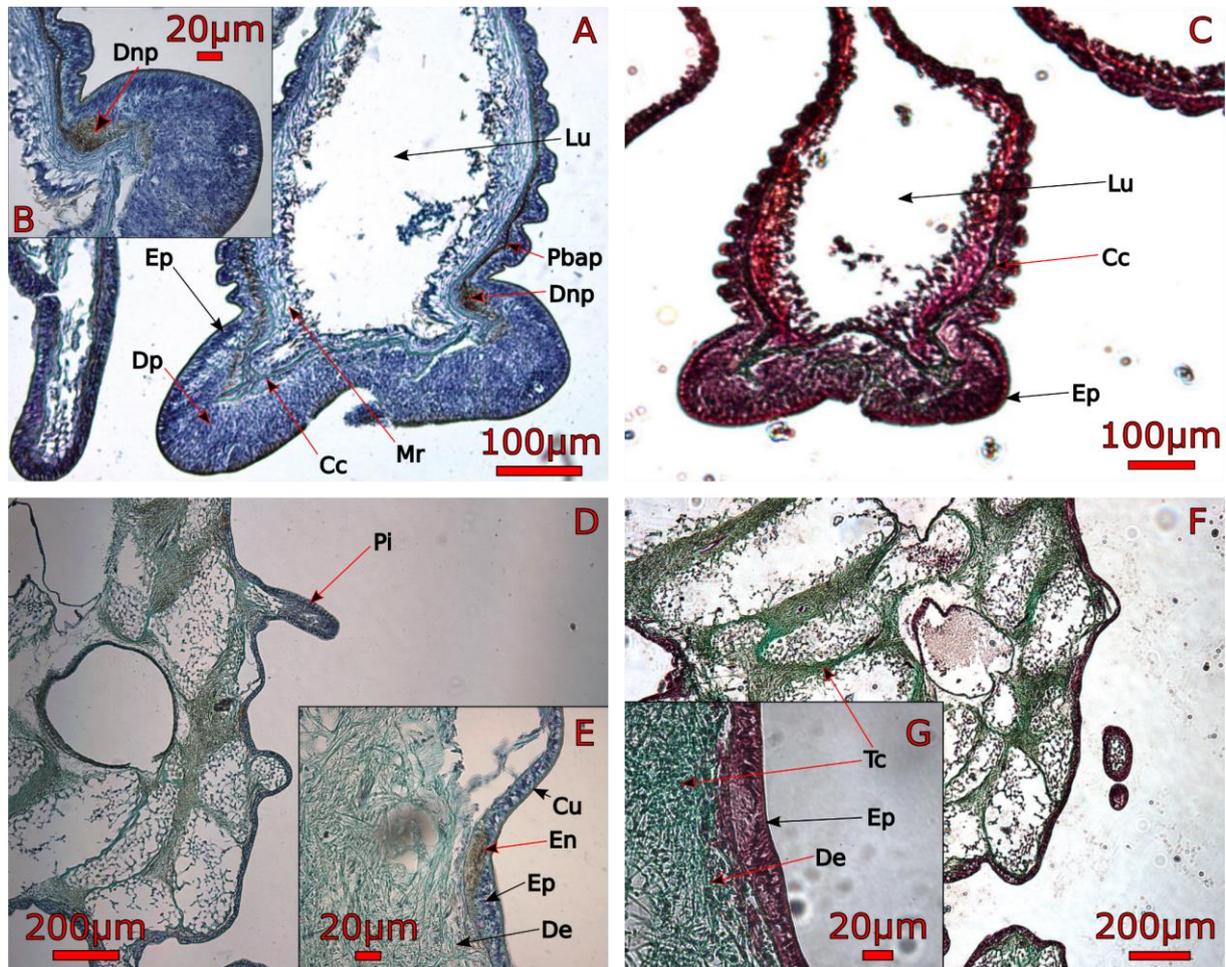


Figure 47 Coupes de *Asterina gibbosa*. Colonne de gauche: coloration immunohistochimique à la DAB avec de l'anti- α -tubuline acétylée. Colonne de droite: trichrome de Masson. A : Podia. D : extrémité du bras.

Légende : Cc : couche conjonctive. Cu : cuticule. En : épaissement nerveux. Ep : épiderme. Dnp : disque nerveux du podium. Lu : lumen. Mr : muscle rétracteur. Pbp : plexus basiépithélial du podium. Pi : piquant. Tc : tissus conjonctifs.

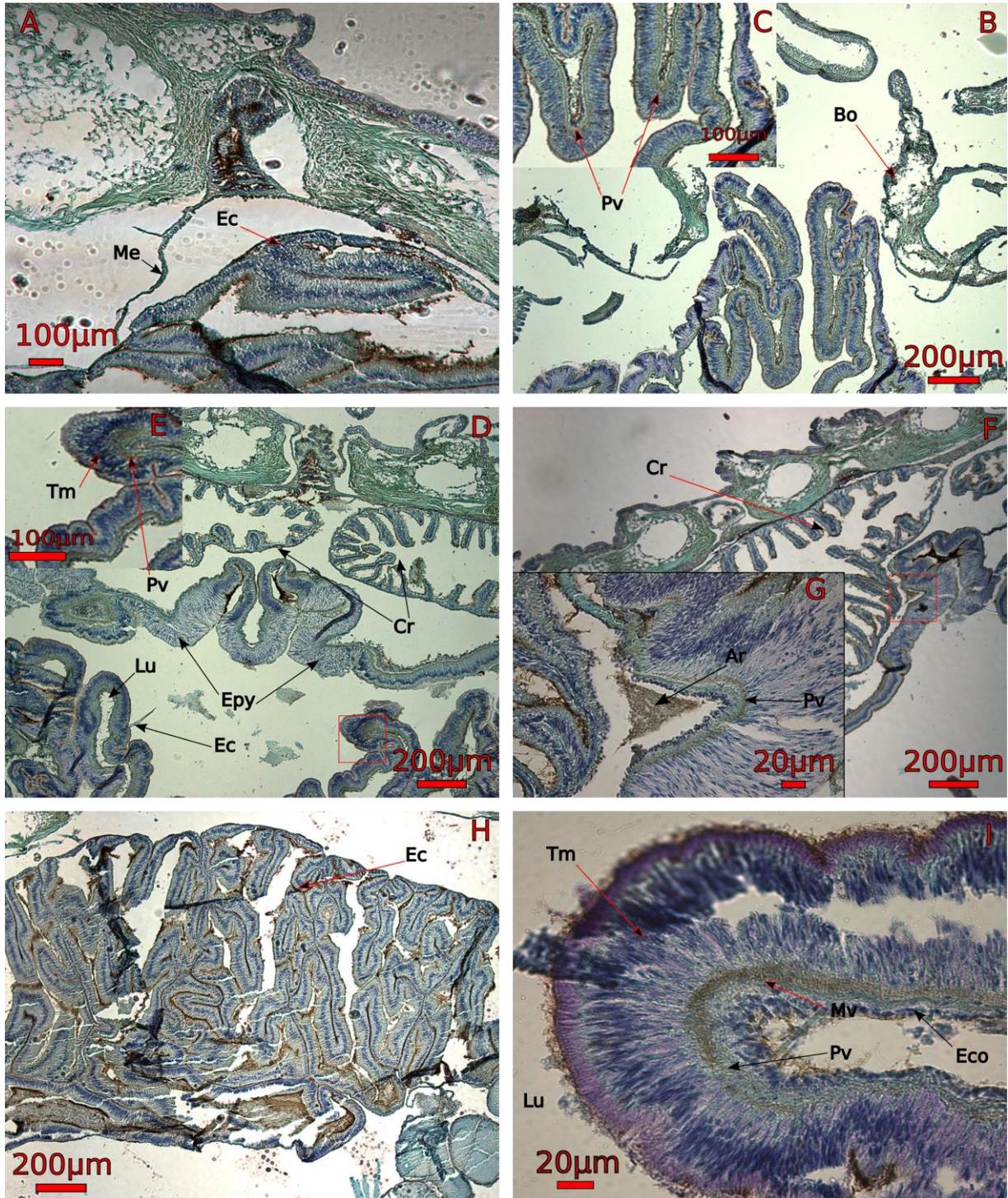


Figure 48 Coupes de *Asterina gibbosa*. Colonne de gauche et de droite : coloration immunohistochimique à la DAB avec de l'anti- α -tubuline acétylée. A : mésentère reliant l'estomac cardiaque à la cavité coelomique. B : Bouche avec estomac cardiaque. C : estomac cardiaque. D : estomac pylorique, avec au-dessus les caeca rectaux. E : estomac cardiaque. F : estomac pylorique. G : triangle nerveux. H : estomac cardiaque. I : estomac cardiaque.

Légende : Ar : artefact. Bo : bouche. Cr : caeca rectaux. Ec : estomac cardiaque. Eco : épithélium coelomique. Lu : lumen. Mv : muscle viscéral. Tm : tissus mucosaux. Epy : estomac pylorique. Pv : plexus viscéral.

c. Anticorps « luciférase d'ophiure » sur *Asterina gibbosa* : coupes transversales

Le canal du sable large de 107,4 μm marque une coloration brune très foncée. Le tégument apparaît uniformément bleu (Fig.49A).

A la DAB, la cuticule du piquant, large de 12,3 μm apparaît bleu foncé. L'épiderme du piquant de l'étoile est de couleur bleu très foncé et est épais de 20 μm . Le plexus basiépithélial est marqué de brun et mesure 8,4 μm . Après le plexus basiépithélial vient le derme bleu très clair (Fig.49A, B)

Les tissus musculaires larges de 101,4 μm parallèles au canal ambulacraire présentent des fibres teintées de brun (Fig.49C).

Le podion quant à lui est bleu très foncé et noir à certains endroits. Le disque nerveux est légèrement visible en brun très foncé. La cuticule est bleu foncé et épaisse de 13,7 μm . Les couches conjonctives sont teintées de bleu : la couche conjonctive externe de 8 μm est plus dense et plus foncée. La couche conjonctive interne de 4 μm est bleu très clair. Les muscles rétracteurs sont d'aspect fibreux, bleu légèrement foncé et large de 28,3 μm (Fig.49D).

Le nerf radiaire ne marque aucune coloration brune, il est uniformément bleu clair sauf la cuticule qui est dense et très foncée (Fig.49E).

L'estomac est uniformément brun très foncé (Fig.49F).

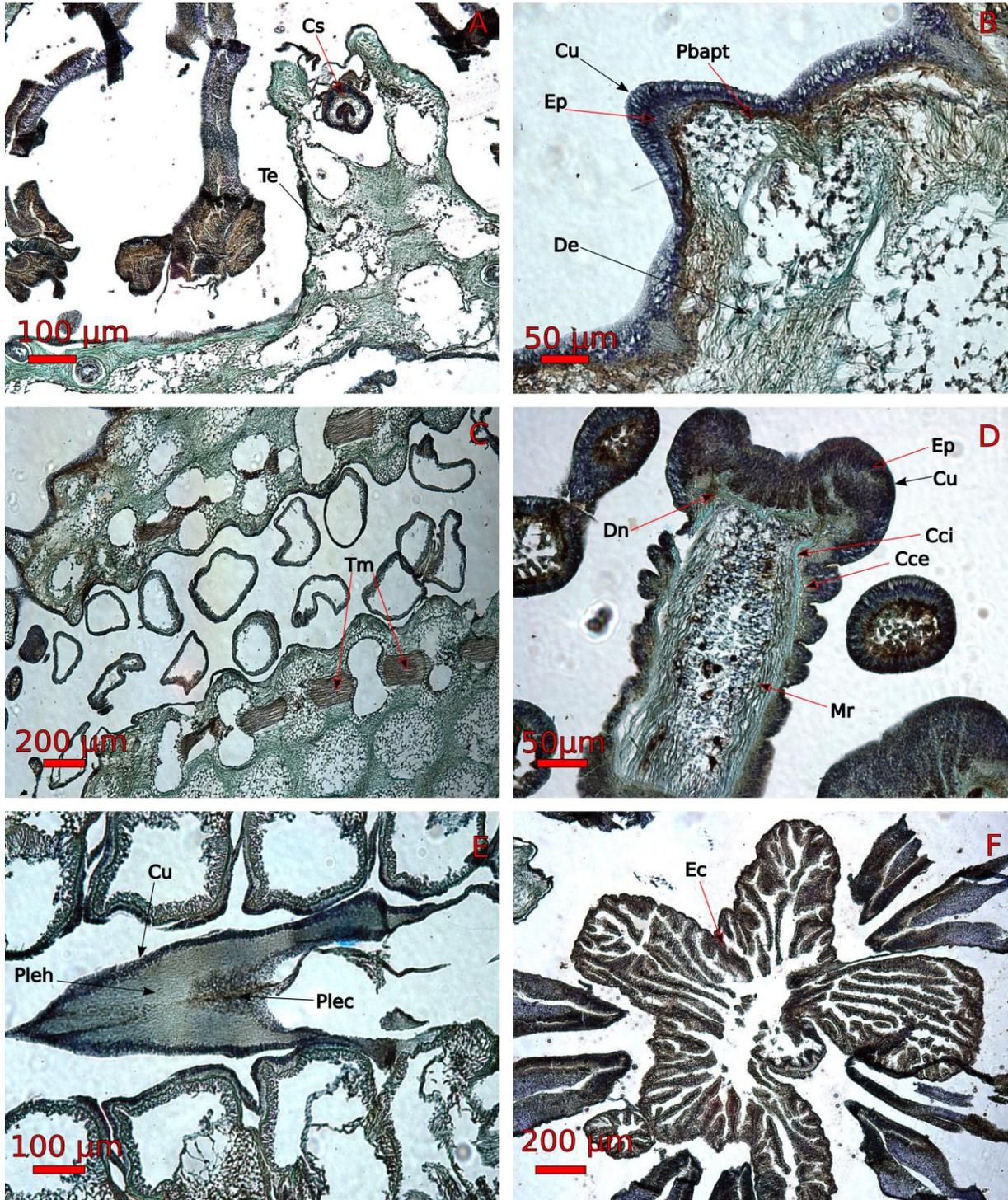


Figure 49 Coupes de *Asterina gibbosa*. Coloration immunohistochimique à la DAB avec l'anticorps « luciférase d'ophiure ». A : Epiderme. B : piquant. C : canal ambulacraire. D : podion. E : nerf radiaire. F : estomac cardiaque.

Légende : Cce : couche conjonctive externe. Cci : couche conjonctive interne. Cs : canal du sable. Cu : cuticule. Ep : épithélium. De : derme. Dn : disque nerveux. Ec : estomac cardiaque. Mr : muscle rétracteur. Plec : plexus ectoneural. Pleh : plexus hygoneural. Pbapt : plexus basiépithélial du tégument. Te : tégument. Tm : tissu musculaire.

4.2.2.2 *Asterias rubens*

a. Anticorps anti- α -tubuline acétylée sur *Asterias rubens* : coupes transversales

Une coloration brune marque le disque nerveux qui entoure le tube du podion ainsi que son centre (Fig.50B). Un ganglion de 87,7 μm est visible au niveau du disque nerveux. L'intensité de la coloration bleue est variable au niveau du disque du podion. Au centre du disque du podion, se situe un marquage. Celui-ci pourrait venir d'artefacts. La couche de cellules venant immédiatement après ce marquage central est de nature fibreuse, musculaire et épaisse de 89 μm . Vient ensuite une couche de cellules conjonctives bleu clair fine de 8,7 μm , puis une couche épaisse de 40,7 μm de cellules conjonctives compactes. Le disque nerveux se situe entre cette dernière couche de cellules conjonctives compactes et l'épiderme du podion.

Le canal ambulacraire possède beaucoup de replis musculaires qui apparaissent bleu clair à la coloration à la DAB. Le nerf marginal épais de 31,7 μm marque une coloration brune très foncée (Fig.50A, C, D). Le nerf est bordé par une fine couche conjonctive bleu ciel. Le canal ambulacraire est très musculeux. (Fig.50A)

Le nerf radiaire présente aussi une coloration brune très marquée mais avec des nuances : le plexus hyponeural est très foncé tandis que le plexus ectoneural est plus clair. L'ensemble de ces deux plexus est large de 52,9 μm . La cuticule du nerf est bleue et épaisse de 22,7 μm (Fig.50E).

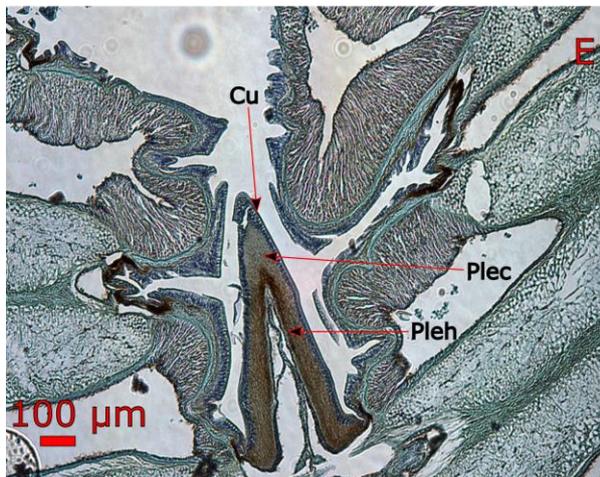
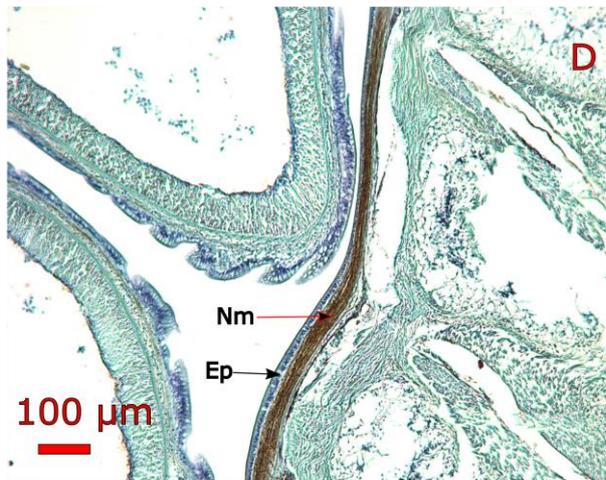
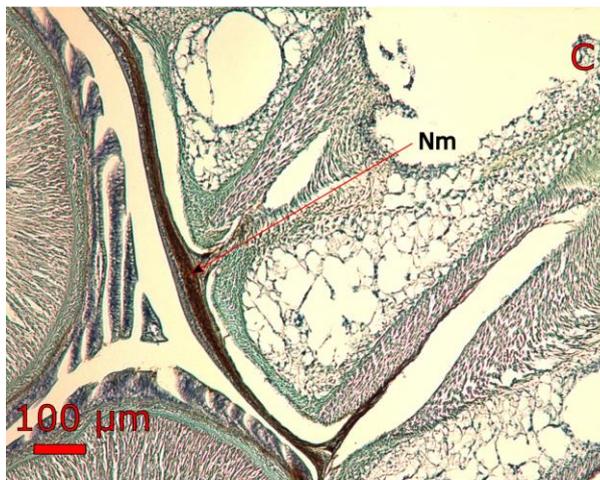
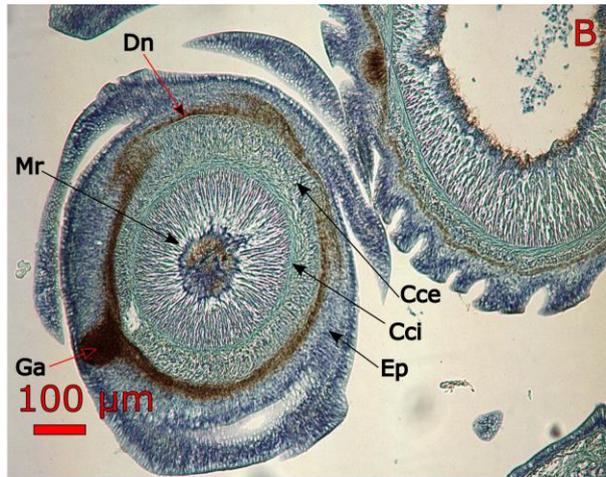
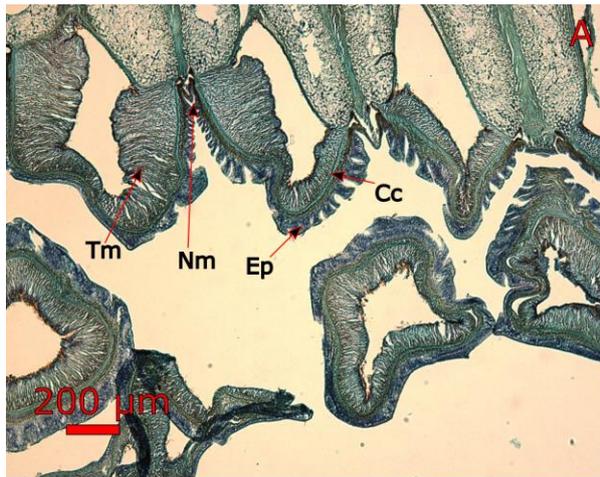


Figure 50 Coupes de *Asterias rubens*. Coloration immunohistochimique à la DAB avec de l'anti- α -tubuline acétylée. A : canal ambulacraire avec les podia. B : podia. C : canal ambulacraire. E : nerf radiaire.
 Légende : Ca : canal ambulacraire. Cc : couche conjointive Cce : couche conjointive externe. Cci : couche conjointive interne. Cu : cuticule. Dn : disque nerveux. Ep : épiderme. Ga : ganglion. Mr : muscle rétracteur. Nm : nerf marginal. Pbab : plexus basiépithélial. Plec : plexus ectoneural. Pleh : plexus hyponeural. Tm : tissus musculaires.

b. Anticorps anti-sérotonine sur *Asterias rubens* : coupes transversales
Aucun marquage brun à la DAB n'est visible (Fig.51).

Le plexus basiépithélial du podion ainsi que le nerf radiaire sont bleus. L'estomac cardiaque est entièrement bleu.

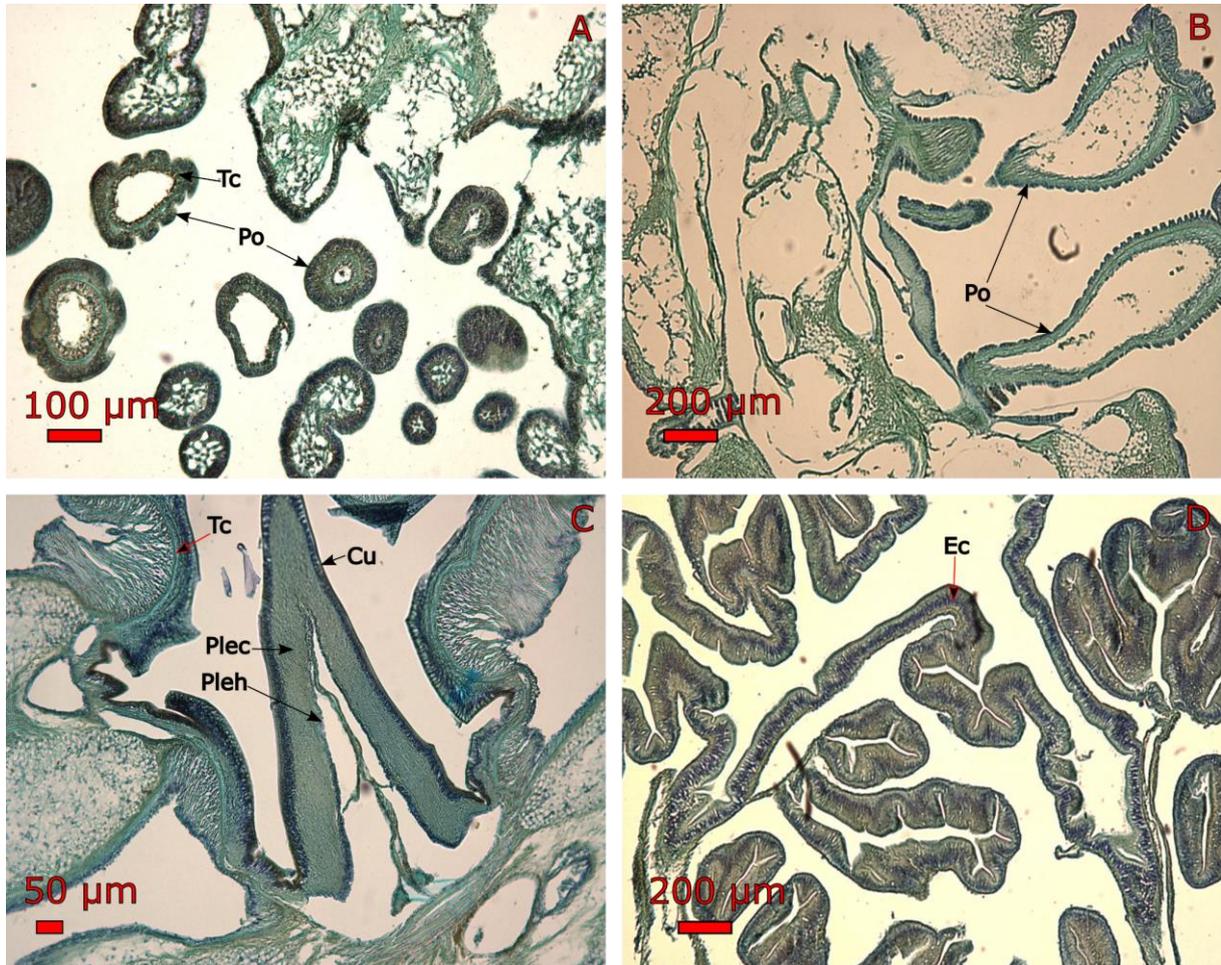


Figure 51 Coupes de *Asterias rubens*. Coloration immunohistochimique à la DAB avec de l'anti sérotonine. A : canal ambulacraire avec podia. B : podia. C : nerf radiaire. D : estomac cardiaque.

Légende : Cu : cuticule. Ec : estomac cardiaque. Plec : plexus ectoneural. Pleh : plexus hyponeural. Po : podia. Tc : tissu conjonctif.

5. Discussion

5.1 Comparaison de la morphologie externe des deux étoiles de mer modèles

Asterina gibbosa est une petite étoile trapue, constituée d'un large disque central et de bras courts, tandis que *Asterias rubens* est une étoile beaucoup plus grande, avec des bras plus fins et longs. Les observations au binoculaire et au microscope électronique à balayage révèlent que l'espèce *Asterina gibbosa* ne possède pas de pédicellaires contrairement à *Asterias rubens*. Elle possède de façon générale et proportionnellement à la taille des individus, des piquants plus courts que l'étoile de mer *Asterias rubens*. *Asterina gibbosa* possède deux rangées de podia tandis que *Asterias rubens* en a 4.

5.2 Description et analyse de la morphologie interne des deux étoiles *Asterina gibbosa* et *Asterias rubens*

Dans le contexte de ce travail, l'organisation interne générale des deux étoiles de mer ne diffère pas. Aucune comparaison morphologique n'a donc été effectuée. Lorsqu'un test n'a été pratiqué que sur l'une des deux espèces, ce sera précisé.

a. Système nerveux principal

Les colorations immunohistochimiques révèlent que les plexus hyponeuraux et ectoneuraux des cordons nerveux radiaires sont positifs à l' α -tubuline acétylée et contiennent donc des neurones chez les deux espèces ce qui rejoint Garcia-Arraras et Viruet (1993) qui avait étudié ces deux plexus chez les holothuries. Aucun marquage de la tubuline acétylée n'est visible dans la cuticule du cordon nerveux. Les cellules nerveuses constituant les plexus hyponeuraux et ectoneuraux ont un aspect décondensé et uniforme. Les colorations au Trichrome de Masson réalisées chez *A. gibbosa* indiquent une présence beaucoup plus faible en fibres conjonctives de soutien dans ces deux tissus en comparaison avec l'espèce *A. rubens*. A l'extrémité du bras, le nerf radiaire se divise en deux afin de former les nerfs marginaux. Les nerfs marginaux présentent chez les deux étoiles un résultat positif à l'immunohistochimie testant la présence d' α -tubuline acétylée.

Il n'y a aucun marquage concernant l'anticorps « luciférase d'ophiure » dans le système nerveux principal de *A. gibbosa*.

A l'inverse des ophiures investiguées précédemment, l'enzyme ne semble pas exprimée au sein du système nerveux principal des deux étoiles modèles.

Les immunohistochimies indiquent une absence totale de la sérotonine au sein du système nerveux principal d'*A. rubens* ce qui confirme l'hypothèse émise par Beer, Moss et Thorndyke (2001) sur l'absence de sérotonine chez les échinodermes adultes.

b. Parois du corps

Les immunohistochimies réalisées sur le tégument d'*A. gibbosa* indiquent la présence d'un plexus nerveux granuleux (plexus basiépithélial) contenant de l' α -tubuline acétylée entre l'épiderme et le derme. Cela confirme donc le caractère épithélioneurien des échinodermes avancé par Beaumont et Cassier (1983). Ce plexus nerveux est continu dans les piquants de l'étoile. Le marquage indique un épaissement nerveux au niveau de l'épiderme entre les piquants au niveau de l'intersection des ossicules. Cet épaissement nerveux entre les ossicules longe tout l'épiderme de l'étoile et sert probablement à innover les muscles dorsaux qui permettent à l'étoile de bouger les bras pour se déplacer. Aucun marquage n'est présent dans le derme de l'étoile ce qui indique une absence de cellules nerveuses.

Les colorations au Trichrome de Masson réalisées chez *A. gibbosa* nous indiquent que le derme de l'étoile de mer est constitué de fibres conjonctives contrairement à l'épiderme qui apparaît de couleur rose. Le derme est parsemé de cavités qui correspondent aux emplacements des ossicules avant décalcification.

Toujours chez *A. gibbosa*, le mésentère qui soutient l'estomac cardiaque ne présente aucun marquage : il n'y a pas d' α -tubuline acétylée. L'épithélium coelomique est positif à l' α -tubuline acétylée et s'épaissit à un endroit. Cet épaissement pourrait correspondre aux nerfs marginaux.

Un fort marquage brun est visible au niveau des papules mais n'est pas clair et n'est donc pas interprétable.

La « luciférase-like » est très présente au niveau de l'épiderme externe d'*A. gibbosa* et plus particulièrement sur l'épiderme des piquants. L'enzyme semble exprimée chez l'étoile de mer *A. gibbosa* mais son pattern d'expression semble beaucoup plus restreint que dans le cas de certaines ophiures (Delroisse et al. 2017).

La protéine cible ne semble pas constituer un marqueur général du système nerveux chez les espèces investiguées dans ce travail.

Les expériences indiquent une absence totale de sérotonine chez *A. rubens*.

c. Système aquifère

L'immunohistochimie révèle que les podia possèdent de l' α -tubuline acétylée au niveau du plexus basiépithélial du tube ainsi qu'au niveau du ganglion et du disque nerveux. Le plexus basiépithélial du podion permet aux muscles de celui-ci de se contracter et de lui donner sa mobilité, il a donc un rôle principalement moteur. Il n'y a pas de plexus nerveux contenant de la tubuline au niveau de la plaque madréporite. D'autres investigations avec d'autres anticorps sont envisageables.

L'immunohistochimie de la luciférase démontre une absence de celle-ci au niveau du système vasculaire. Ceci-dit, un léger marquage est visible au niveau de l'anneau nerveux du disque mais n'est pas interprétable. En effet, le disque du podion paraît très foncé. Une deuxième coloration avec un ajustement du temps est donc nécessaire. Le canal du sable est très fortement marqué mais ce marquage semble plutôt correspondre à un « trapping » de l'anticorps. Ceci est dû à la morphologie du canal du sable : les circonvolutions pourraient bloquer les anticorps et provoquer des faux positifs.

Il y a une absence totale de sérotonine dans le système aquifère chez *A. rubens*.

d. Système digestif

Les plexus viscéraux des estomacs cardiaque et pylorique présentent une couleur brune, indicatrice d'une réaction positive à l' α -tubuline acétylée ce qui rejoint Garcia-Ararras et Viruet (1993). Le plexus viscéral de l'estomac cardiaque marque de façon plus intense. Ce fin plexus nerveux permet à l'étoile de contrôler les muscles épais de son estomac cardiaque. L'immunohistochimie de la tubuline sur les caeca pylorique ne semble pas révéler la présence de celle-ci ce contrairement à ce qu'avais dit Jangoux (1982). Cela provient probablement d'un trop faible grossissement lors des observations. D'autres investigations sont donc nécessaires. Au trichrome de Masson, le système digestif ne contient aucun tissu conjonctif. Un épaissement nerveux de forme triangulaire a été observé entre l'estomac pylorique et les caeca rectaux. Cela est probablement dû à des artéfacts : des anticorps se sont retrouvés bloqués et ont donc provoqué un faux positif.

Aucune comparaison n'a pu être faite avec la littérature acquise dans le cadre de ce travail ce qui renforce donc l'hypothèse de l'artefact.

A. gibbosa possède de la luciférase au niveau de l'estomac cardiaque mais il est impossible de la localiser correctement même à fort grossissement suite aux interférences de la coloration sur la coupe. Lors de prochains tests, il faudra diminuer le temps de révélation.

La sérotonine est absente du système digestif chez *A. rubens*.

Le fait que le gène pour la sérotonine soit exprimé chez les larves et ne le soit plus chez les adultes pourrait s'expliquer par le fait de réarrangements de l'ADN lors de la transformation de la larve. Ceci étant plausible au vu de changements aussi importants tel que le passage d'une symétrie bilatérale à l'état larvaire à une symétrie pentaradiée à l'état adulte.

e. Tableau récapitulatif des zones marquées

Tableau 1 Tableau récapitulatif des zones marquées. Positif = cellules nerveuses réagissant à l'anticorps. Négatif = pas de cellules nerveuses réagissant à l'anticorps. / = pas de coupe disponible en immunohistochimie.

Système	Zone		α tubuline	« luciférase d'ophiure »	Sérotonine
Composants du système nerveux principal	Cordon nerveux radiaire	Plexus hyponeural	Positif	Négatif	Négatif
		Plexus ectoneural	Positif	Négatif	Négatif
	Nerf marginal		Positif	Négatif	Négatif
Système aquifère	Podia	Plexus basiépithélial du tube	Positif	Négatif	Négatif
		Anneau nerveux du disque	Positif	Sans avis	Négatif
	Canal du sable		/	Négatif	/
	Madréporite		Négatif	/	/
Parois du corps	Epiderme externe		Positif	Positif	/
	Mésentère		Négatif	/	/
	Epithélium coelomique		Positif	/	/
	Epines		Positif	Positif	/
	Papilles		Négatif	/	/
	Ocelle		Positif	/	/
Système digestif	Estomac cardiaque		Positif	Positif	Négatif
	Estomac pylorique		Positif	/	/
	Caeca pylorique		Négatif	/	/

5.3 Application MetaMorphos

Les informations morphologiques collectées lors de ce travail ont contribué à la réalisation d'un modèle biologique par l'infographiste du laboratoire pour l'application MetaMorphos de l'Université de Mons.

Cette application permet aux étudiants de distinguer les différents systèmes sans recourir à une dissection. Ils pourront ainsi observer en trois dimensions les différents systèmes de l'étoile de mer (Fig.52).

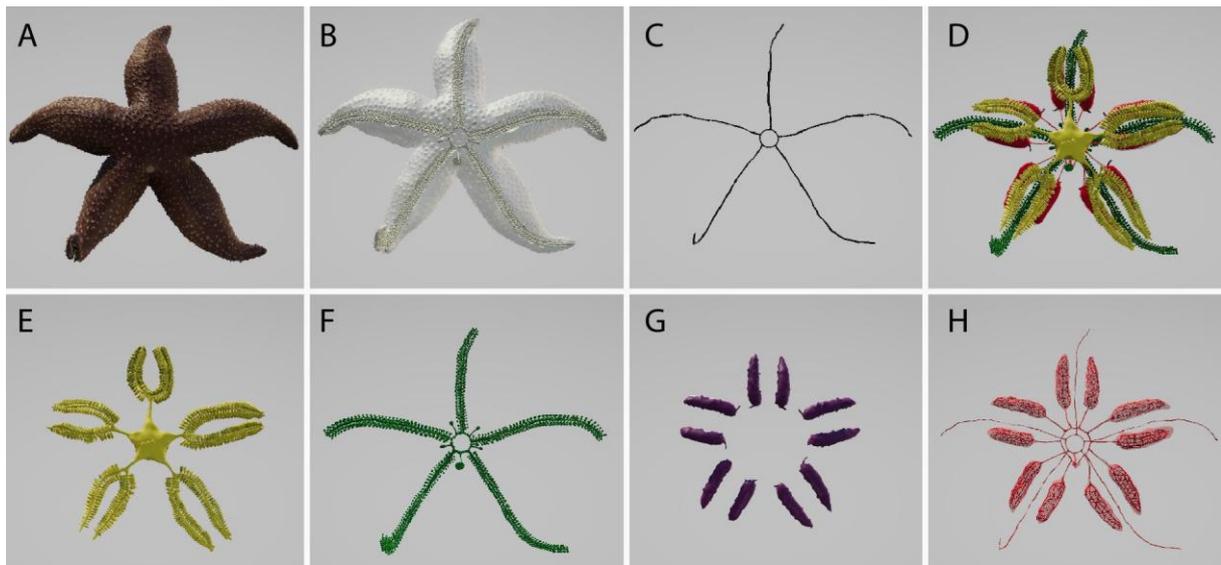


Figure 52 Modèles de l'application MetaMorphos avec en A la face aborale, en B la face orale, en C le système nerveux, en D tous les systèmes confondus, en E le système digestif, en F le système aquifère, en G le système reproducteur et en H les systèmes hémal et périhémal.

6. Conclusion

a. Conclusion générale

L' α -tubuline acétylée prend une part très importante dans le système nerveux principal et périphérique des étoiles de mer. Cette mise en évidence rejoint la littérature existante et démontre l'utilité de cet acteur moléculaire.

Un fin plexus nerveux est présent dans l'ocelle terminal. Cette présence n'a pas été prouvée dans les recherches bibliographiques effectuées.

L'expression de la luciférase a été mise en évidence chez *A. gibbosa* surtout au niveau des piquants, une fonction métabolique (non liée à la bioluminescence) de cette enzyme a été démontrée chez l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* (Fortova et al, 2013). La luciférase semble aussi exprimée chez les étoiles. De manière intéressante, cette enzyme est aussi exprimée au sein des piquants des ophiures où elle est utilisée dans le cadre de l'émission de la bioluminescence (Delroisse, 2017). La présence d'une potentielle protéine homologue de la « luciférase d'ophiure » a aussi été constatée dans l'estomac cardiaque et il est plus que probable qu'elle soit également présente dans les podia. L'anticorps « luciférase d'ophiure » n'a pas pu être testée chez *A. rubens*.

Il y a une absence totale de sérotonine chez *A. rubens* adulte. L'anticorps anti-sérotonine n'a pas été testé chez *A. gibbosa*.

b. Perspectives

Lors de prochains travaux, les temps de révélation devront être réévalués afin de diminuer le risque d'interférence et de « trapping » d'anticorps.

Le travail réalisé ici n'effleure que la surface de l'étude du système nerveux des échinodermes et donne des pistes pour une étude plus complexe et poussée. Il a aussi permis la réalisation de plus de 400 coupes histologiques exploitables et actuellement utilisées au laboratoire comme « catalogue » morphologique des espèces investiguées.

L'étude sera poursuivie par des chercheurs du laboratoire afin de mieux caractériser l'architecture du système nerveux des étoiles de mer et de mieux comprendre comment ce système nerveux décentralisé permet aux étoiles de mer d'effectuer des comportements complexes particuliers tels que la dévagination de l'estomac cardiaque inférieur ou l'émission synchronisées des gamètes dans la masse d'eau.

7. Références

7.1 Bibliographie

1. **Beaumont, A. et P.Cassier, 1983.** *Biologie Animale: Des Protozoaires Aux Méatozaires Épithélioneuriens*, Tome 2. Paris, Dunod.
2. **Beer, A. J., C. Moss, et M.Thorndyke, 2001.** Development of Serotonin-like and SALMFamide-like Immunoreactivity in the Nervous System of the Sea Urchin *Psammechinus Miliaris*, *Biological Bulletin*, **200** (3): 268–80.
3. **Castric A., A. Girard , C. Michel , 1987.** *Roches sous-marines de bretagne, faune et flore fixées* , ADMS. Concarneau..
4. **Clark, Ailsa M., Downey M.,1992.** *Starfishes of the Atlantic*, New York ,Chapman and Hall.
5. **Cottrell, G. A., et V. W. Pentreath , 1970.** Localization of Catecholamines in the Nervous System of a Starfish, *Asterias rubens*, and of a Brittlestar, *Ophiothrix fragilis*, *Comparative and General Pharmacology*, **1** : 73–81.
6. **Delboni,M., 2008.** Description Des Structures Calcaires de L'holothurie Apode *Synaptula Hydriformis*, *La bêche-de-mer - Bulletin de la CPS* **27** : 13
7. **Delroisse, J., E. Ullrich-Lüter, S. Blaue, I. Eeckhaut, P. Flammang, J. Mallefet,2017.** Fine structure of the luminous spines and luciferase detection in the brittle star *Amphiura filiformis*, *Zoologischer Anzeiger*, **269** : 1-12
8. **Diaz-Balzac, C. A., W., Mejias, L.B Jimenez,& J.E. Garcia-Arraras,2010.** The catecholaminergic nerve plexus of Holothuroidea. *Zoomorphology*, **129** : 99–109.
9. **Elphick, R. Maurice, R.H. Emson, et M. Thorndyke, 1989.** In the Nervous FMRFamide-like Immunoreactivity System of the Starfish *Asterias Rubens*, *The Biological Bulletin*. **177**: 141–45.
10. **Emson R.H., R.G.,Crump ,1983.** The natural history, life history and ecology of the two british species of *Asterina*. *Field studies* **5** : 867-882
11. **Fortova, A., E. Sebestova, V. Stepankova, T. Koudelakova, L. Palkova, J. Damborsky, R.Chaloupkova,2013.**DspA from *Strongylocentrotus purpuratus*: The first biochemically characterized haloalkane dehalogenase of non-microbial origin, *Biochimie*, **95** : 2091-2096.

12. **García-Arrarás, E.José, M. Rojas-Soto, L.B. Jiménez, et M. Díaz, 2001.**
The Enteric Nervous System of Echinoderms: Unexpected Complexity Revealed by Neurochemical Analysis, *The Journal of Experimental Biology*, **204** : 865–73.
13. **García-Arrarás, E.José, M. Díaz, I. Torres, I. File, L.B. Jiménez, K. Rivera-Bermudez, E.J. Arroyo , et W.Cruz, 1999.** Regeneration of the Enteric Nervous System in the Sea Cucumber *Holothuria Glaberrima*, *The Journal of Comparative Neurology*, **406** : 461–75.
14. **Goldstein, J., D.E. Newbury, D.C. Joy, C.E Lyman, P. Echlin, E. Lifshin, L. Sawyer, J.R. Michael. 2003.** *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Berlin, Springer.
15. **Gozes I., 1982.** Tubulin in the nervous system. *Neurochemistry International*. **4** : 101-120
16. **Hay-Schmidt, A., 2000.** The evolution of the serotonergic nervous system. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. **267** : 1071-1079
17. **Huet, M., 1975.** Le rôle du système nerveux au cours de la régénération du bras chez une étoile de mer: *Asterina Gibbosa* Penn.(Echinoderme, Astéride). *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **33** :535–552
18. **Hyman, L. H., 1955.** *The Invertebrates: Echinodermata the Coelomate Bilateria, Vol. IV*. New-York, Mcgraw-hill Book Company.
19. **Jangoux, M., 1982.** Etude structurelle et fonctionnelle du tube digestif d'*Asterias rubens* L. (Echinodermata:Asteroidea).*Echinoderm Conference :Australian Museum Memoir* **16**: 17–38.
20. **Koehler R., 1921.** *Faune de France 1 : échinodermes*, Ed. Librairie de la faculté des sciences. Lyon.
21. **Loening A.M., T.D. Fenn, S.S. Gambhir, 2007.** Crystal structures of the luciferase and green fluorescent protein from *Renilla reniformis*. *J. Mol. Biol.* **374** : 1017–1028
22. **Luther W., K. Fiedler , 1987,** *Guide de la faune sous-marine des cotes méditerranéennes* , Ed. Delachaux & Niestle, 2ème édition, [sl]
23. **Mashanov, V. S., O. R. Zueva, , T. Heinzeller, B. Aschauer, , & I. Y. Dolmatov, ,2007.** Developmental origin of the adult nervous system in a holothurian: An attempt to unravel the enigma of neurogenesis in echinoderms. *Evolution and Development*, **9** :244–256.

24. **Mashanov, V. S., R. Zueva, T. Heinzeller, 2008.** Regeneration of the radial nerve cord in a holothurian: A promising new model system for studying post-traumatic recovery in the adult nervous system. *Tissue Cell*, **40** :351–372.
25. **Moss, C., R.D. Burke, et M.C. Thorndyke, 1994.** Immunocytochemical Localization of the Neuropeptide S1 and Serotonin in Larvae of the Starfish *Pisaster ochraceus* and *Asterias rubens*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **74**: 61–71.
26. **O'Dowd, G., P. R. Wheeler, B. Young, P. Woodford. Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheeler, 2015.** *Atlas d'histologie fonctionnelle*. Paris. De Boeck Supérieur.
27. **Picton, B.E., 1983.** A field guide to the shallow-water echinoderms of the british isles, Immel Publishing, UK, 96p.
28. **Pugliese, C., R. Mazza, P. L. R. Andrews, M. C. Cerra, G. Fiorito, et A. Gattuso, 2016.** Effect of Different Formulations of Magnesium Chloride Used As Anesthetic Agents on the Performance of the Isolated Heart of *Octopus vulgaris*. *Frontiers Media SA*.
29. **Rowland, J., 1906.** *The Psychophysical Organism and Nervous System*, 3^{ème} ed entièrement refondue. New York: Henry Holt and Company,
30. **Ruppert, E., et D.R. Barnes, 1994.** *Invertebrate Zoology*, 6^e ed, Etats-unis, Harcourt Brace College Publishers.
31. **Telford M.J., C. J. Lowe, C. B. Cameron, O. Ortega-Martinez, J. Aronowicz, P. Oliveri, R. R. Copley, 2014.** Phylogenomic analysis of echinoderm class relationships supports Asterozoa. *Proceedings of the royal society* **281** :20140479
32. **Venteo, L., E. Velot, 2010.** L'Importance de la Fixation en Histochimie. *Revue française d'histotechnologie*. **23** : 25-32
33. **Vevers, H G. 1949.** The Biology of *Asterias rubens* L.: Growth and Reproduction. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **28** (1): 165–87.
34. **Weinberg S., 2004.** *Découvrir l'atlantique, la manche et la mer du nord*, ed. Nathan nature, 384p.
35. **Wilkinson, L. O., C. T. Dourish. 1991** Serotonin and animal behavior. Serotonin receptor subtypes: basic and clinical aspects. *Receptor Biochem. Methodol.* **14** :147-210.

36. **Yaguchi, S., H. Katow. 2003.** Expression of tryptophan 5-hydroxylase gene during sea urchin neurogenesis and role of serotonergic nervous system in larval behavior. *Journal of Comparative Neurology*, **466** : 219–229.
37. **Zueva, O., M. Khoury, T. Heinzeller, D. Mashanova, et V. Mashanov, 2017.** The Complex Simplicity of the Brittle Star Nervous System. *Frontiers in Zoology* **15** (1): 1–43.

7.2 Sitographie

1. **Bay-Nouailhat A., mai 2005.** Description de *Asterias rubens*, [En ligne <<http://www.mer-littoral.org/30/asterias-rubens.php>> , consulté le 19 octobre 2018]
2. **Maran V., P.Scaps, F. Ziemski, S. Jeglot 2018** : *Asterias rubens* Linnaeus, 1758, [En ligne <<http://doris.ffessm.fr/Especies/Asterias-rubens-Etoile-de-mer-commune-132>> , consulté le 10 avril 2018].
3. **Morin, A., 2002.** Les échinodermes, [En ligne <http://simulium.bio.uottawa.ca/bio2525/Notes/Les_Echinodermes.html> , consulté le 19 octobre 2017].
4. **Scoupe C., 2012.** Fiche espèce n°432 : Astérie bossue, [En ligne <http://fran.cornu.free.fr/affichage/affichage_nom.php?id_espece=432>, consulté le 10 avril 2018].
5. **Wray, G., 1999.** Echinodermata : spiny-skinned animals: sea urchins, starfish, and their allies, [En ligne <<http://tolweb.org/Echinodermata>>, consulté le 17 octobre 2017].
6. **Díaz-Balzac, C.A., J.E. García-Arrarás, 2018.** Echinoderm Nervous System,

7.3 Références des figures

1. Figure 2 : **[SA], 2016.** Définition oursins. [En ligne <<https://www.aquaportail.com/definition-6247-oursin.html>>, consulté le 4 mai 2018].
2. Figure 3 : **[SA], 2007.** Définition ophiure. [En ligne <<https://www.aquaportail.com/definition-446-ophiure.html>>, consulté le 4 mai 2018].
3. Figure 4 : **Denisio, 2016.** Crinoïdes : Lys de mer et comatules. [En ligne <http://www.cap-recifal.com/page/articles.html/_vivant/crino%C3%AFdes-lys-de-mer-et-comatules-r96>, consulté le 4 mai 2018].

4. Figure 5 : **B.E. & Morrow, 2016.** *Asterina gibbosa* (Pennant, 1777). [En ligne < <http://www.habitas.org.uk/marinelife/species.asp?item=ZB1130>>, consulté le 4 mai 2018].
5. Figure 6 : **[SA], 2007.** Définition concombre de mer. [En ligne < <https://www.aquaportail.com/definition-444-concombre-de-mer.html>>, consulté le 5 mai 2018].
6. Figure 8 : **[SA], 2008.** Biosphère marine. [En ligne < http://www.cima.ualg.pt/piloto/UVED_Geochemie/UVED/site/html/2/2-3/2-3-1/index.html >, consulté le 5 mai 2018].
7. Figure 9 : **Maran V., P.Scaps, F. Ziemski, S. Jeglot 2018** : *Asterias rubens* Linnaeus, 1758. [En ligne < <http://neuroscience.oxfordre.com/view/10.1093/acrefore/9780190264086.001.0001/acrefore-9780190264086-e-205>> , consulté le 11 mai 2018].
8. Figure 10 : **Skewes, M., 2008.** *Asterina gibbosa* A cushionstar. [En ligne < <http://www.marlin.ac.uk/species/detail/1563>>, consulté le 17 octobre 2017]
9. Figure 11 : **Houseman J.G., 2002.** Les échinodermes. [En ligne < <http://simulium.bio.uottawa.ca/bio2525/labo/Protocoles/echinode.htm>>, consulté le 3 mai 2018]
10. Figure 13 : **Nilsson D.E., 2013.** Etoile de mer : Un œil au bout des bras. [En ligne < https://www.sciencesetavenir.fr/fondamental/biologie-cellulaire/etoile-de-mer-un-oeil-au-bout-des-bras_37891>, consulté le 3 mai 2018]
11. Figure 15 : **Anjali S., [SD].** Study Notes on *Asterias* : Echinodermata. [En ligne < <http://www.notesonzoology.com/marine-animals/study-notes-on-asterias-echinodermata/1717>>, consulté le 3 mai 2018]
12. Figure 16 : **[SA], 2016.** Un squelette à fleur de peau. [En ligne < <https://www.zoom-nature.fr/echinodermes-un-squelette-a-fleur-de-peau/>>, consulté le 14 décembre 2017]
13. Figure 17 : **Anjali S., [SD].** Study Notes on *Asterias* : Echinodermata. [En ligne < <http://www.notesonzoology.com/marine-animals/study-notes-on-asterias-echinodermata/1717>>, consulté le 3 mai 2018]
14. Figure 20 : **Morin A., J. Houseman, [SD].** Planches des échinodermes [En ligne < http://ressources.unisciel.fr/zoologie/Echinodermes/Planche_Echinodermes.htm >, consulté le 5 mai 2018]

15. Figure 21 : **Morin A., J. Houseman, [SD]**. Planches des échinodermes [En ligne <
http://ressources.unisciel.fr/zoologie/Echinodermes/Planche_Echinodermes.htm>, consulté le 5 mai 2018]
16. Figure 31 : **[SA],. 2017.** [En ligne <
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=668987>>, consulté le 14 décembre 2017].

8. Annexes