



**HAL**  
open science

# Evolution du système nerveux et du comportement chez le poisson cavernicole aveugle *Astyanax mexicanus*

Yannick Elipot

► **To cite this version:**

Yannick Elipot. Evolution du système nerveux et du comportement chez le poisson cavernicole aveugle *Astyanax mexicanus*. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T014 . tel-00978774

**HAL Id: tel-00978774**

**<https://theses.hal.science/tel-00978774>**

Submitted on 14 Apr 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS XI  
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD  
Ecole Doctorale 419 – Biosigne

## **Thèse de Doctorat**

pour obtenir le grade de

## **Docteur de l'Université Paris-Sud XI**

Discipline : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement par

**Yannick Elipot**

Le 17 avril 2013



## **Evolution du système nerveux et du comportement chez le poisson cavernicole aveugle *Astyanax mexicanus***

### **Jury de thèse :**

Pr. Pierre Capy

Dr. Patricia Gaspar

Dr. Germán Sumbre

Dr. Laure Bally-Cuif

Dr. Xavier Cousin

Dr. Sylvie Rétaux

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directrice de thèse



**Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire**

**CNRS**

**Institut de Neurobiologie Alfred Fessard**

**UPR3294 Neurobiologie et Développement NeD**

**Equipe Développement et Evolution du Cerveau Antérieur**

**Bâtiment 32**

**1 Avenue de la Terrasse**

**91190 Gif sur Yvette**



*« Je me sers des animaux pour instruire les hommes ».*

*Jean de la Fontaine*

*« Celui qui connaît vraiment les animaux est par là même capable de comprendre le caractère unique de l'homme ».*

*Konrad Lorenz*



*Au cours de ma thèse, j'ai été amené à rencontrer des personnes d'exceptions qui m'ont permis d'avancer dans mon cursus dans les meilleures conditions possibles. Je tiens à les remercier ici.*

*Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail. En premier lieu, je remercie chaleureusement les rapporteurs Patricia Gaspar et German Sumbre qui ont accepté de consacrer leur temps précieux à la lecture attentive de mon manuscrit. Je remercie les examinateurs Laure Bally-Cuif et Xavier Cousin pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux. Enfin, je remercie Pierre Capy qui a accepté de présider ce jury. Grâce à vos expertises, les discussions que nous aurons le jour de la soutenance s'annoncent passionnantes.*

*Je remercie Philippe Vernier qui a accepté de m'accueillir dans son unité, d'abord en tant que stagiaire puis en tant que thésard. Merci pour votre gentillesse et votre bienveillance.*

*Un million de mercis pour toi Sylvie. Tu m'as fait confiance lorsque je suis arrivé pour mon stage de M2, puis à nouveau lorsque tu es devenue directrice de ma thèse. Tu as accepté un petit étudiant qui ne connaissait rien à l'évolution et au développement dans ton équipe et tu as pris le temps de combler ces lacunes. Merci pour ta bienveillance constante, ta patience que j'ai parfois (souvent ?) mise à l'épreuve et ta confiance. Merci de m'avoir laissé « tailler » ma route à travers champs pour mettre en place les tests de comportement. Tu as su me guider lorsque je partais dans mes délires, lorsque je couvrais la paillasse de schémas dans tout les sens pour trouver les meilleurs tests possibles. Personne ne comprenait ce que je dessinais, mais tu as su me laisser le temps de mettre mes idées au clair pour les exposer. J'ai vraiment pu m'épanouir au cours de ces années et je sais que c'est grâce à toi, à ton soutien sans faille et à ta présence rassurante. Le terme de « maman scientifique » prend tout son sens lorsqu'on travaille à tes côtés. Je ne pouvais pas rêver meilleure directrice de thèse. Merci pour tout ça.*





Merci à Laurent pour tous les bons moments passés. Notre binôme n'a pas été surnommé « la dream-team de la FIV » pour rien ! Le moins qu'on puisse dire, c'est qu'on ne s'ennuie pas quand tu es dans les parages (finalement, est-ce que tu brilles vraiment dans le noir ?). Du labo au Mexique, tu es vraiment quelqu'un sur qui on peut compter, quel que soient les sujets (maniement des injecteurs, de l'épervier qu'on appelle « hamaco » en espagnol, des bières...) Venir faire les nuits blanches au labo n'était pas une contrainte pour moi parce que je savais qu'on allait bien rigoler en plus de bosser. Je n'oublierai pas de si tôt toutes nos discussions. J'ai non seulement appris sur le boulot mais aussi sur l'aquariophilie à tes côtés. Ne change pas !

Merci Jacques d'avoir accepté de m'aider à comprendre un peu plus ce qui se passait dans la tête de nos poissons. En plus d'avoir été un pilier dans l'ensemble de ce travail, tu as aussi été pour moi un mentor pour les statistiques. Merci pour ton aide, ta patience, d'avoir toujours été disponible et pour tous tes conseils, sur la biologie comme sur le reste. Je tiens aussi à remercier l'ensemble du service de biochimie de l'hôpital Lariboisière et en particulier Jean-Marie Launay de m'avoir si bien accueilli au cours de ces années.

Je remercie l'ensemble ~~des cas~~ de l'équipe DECA pour m'avoir supporté pendant toutes ces années : Amandine (ma discrète voisine de bureau, experte du cortex et en dératisation), Hélène (notre « bio-informaticienne » préférée qui semble avoir une dent contre les yeux et les cristallins de nos poissons, allez savoir pourquoi...), Stéphane (nos vies étaient suspendues au bout de tes cordes pendant nos expéditions dans les cavernes mexicaines), Yoní (ethologist of our team and also collaborator for the « Y » team), Maryline (Experte des robots, de l'immuno et des fou-rires) et Alexandre (Bienvenue chez les Astyanaxologues). Il ne faut surtout pas oublier les anciens membres, Karen (un modèle à suivre et la référence en termes de casquettes ....) et Yohann (Que « L'équipe, le sandwich et les clopes » soient avec toi).



Merci aux relecteurs de ma thèse, qui ont corrigé les « fotes d'or tôt graphs » et qui m'ont dit lorsque mes phrases ne voulaient rien dire. Je pense, en outre, à Sylvie et Sylvie, à Adeline et à l'ensemble de ma famille. Un grand merci à Jean pour avoir relu l'intégralité de ma thèse, j'espère que le comportement de mes poissons t'aidera pour la pêche.

Je remercie l'ensemble de l'équipe Bourrat/Joly pour leurs présences et leurs complicités. Echanger avec vous tout au long de l'année ou au cours de « nos cabanes » a été vraiment très enrichissant scientifiquement et humainement. Il faut absolument conserver ce lien inter-équipe qui est si précieux.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes travaillant dans notre couloir (vous savez, celui que les gens de l'INAF appelle le couloir des fous). Merci à Alessandro, Aurélie, Tibi, Johanna (appelez-moi Juanito !), Zlatko, Matthieu, Emilie, Ingrid, Ludo, Dimitri, Adeline, Gaëlle, JB, Joanne, Fred, Françoise, Jean-Mimi, Raphaël, et tous les autres pour votre bonne humeur communicative. Vous avoir à mes côtés m'a soutenu tout au long de ma thèse et vous êtes la preuve vivante qu'on peut travailler et rire en même temps.

Un grand merci à Patrick Parra (notre mécanicien expert) que j'ai beaucoup embêté pour mes « constructions » en tout genre (souvent à faire pour hier). Parler avec toi m'a beaucoup aidé à mettre au point mes différents tests et ton regard pratique m'a été d'un grand secours et m'a permis de garder les pieds sur terre. Au fait, j'attends toujours ma Tour Eiffel en allumette à l'échelle 1/125<sup>ème</sup> !

Merci à Bernard et Nordine d'avoir toujours été présents et patients pour tous nos problèmes informatiques. Je ne vous ai pas épargné de mes (nombreuses) questions.



*Un énorme merci à Odile et Cindy, nos supers secrétaires. Vous avoir avec nous pour assurer tous les éléments administratifs (et pour profiter de votre bonne humeur constante) est réellement une chance.*

*Merci aux personnels de la laverie et de l'animalerie, en particulier Magalie, qui font un travail de fond essentiel. Sans eux, on n'aurait ni poisson ni matériel de manip. En parlant d'animalerie, j'en profite pour remercier nos petits poissons. Je vous ai beaucoup embêté mais je vous aime bien quand même...*

*Je tiens à remercier toute l'équipe de moniteurs que j'ai côtoyée pendant mon monitorat : Thomas, Quentin, Amina, Rémi, Steeve, Pilou, Alexandra ainsi que tous les anciens. J'ai une pensée particulière pour les titulaires telle que Micaela Galante (que carino !), Heather McLean, Sylvie Granon et Hervé Daniel qui ont supporté l'étudiant pendant mes années de fac et qui ont remis le couvert avec le moniteur. Un grand merci pour Laurence Mery qui m'a en plus suivi depuis la L2 en acceptant d'être ma tutrice pendant mes différents stages. Merci à vous de m'avoir appris « les ficelles des profs » et fait confiance pendant les TP. En donnant le meilleur de vous-même en permanence vous m'avez donné envie d'enseigner. J'ai vraiment adoré partager tous ces moments avec vous, ils resteront gravés dans ma mémoire.*

*Merci à toutes les personnes qui m'ont fait découvrir la recherche. Je pense à Martine Heude qui m'a dit que la recherche « ça ne s'explique pas, ça se vit », à Sarah Lambert qui m'a permis de découvrir la levure *S. pombe* et Frédéric Saudou qui m'a accueilli dans son laboratoire. Un très grand merci à Diana Zala qui m'a montré comment faire avancer un projet, monter un élevage de drosophiles (triez les vierges, tuez les autres !) et surtout qui m'a montré qu'on pouvait (voire on devait) faire du bricolage à la paillasse. Merci à toi pour tout, je n'oublierai jamais ce que tu m'as appris.*



*Je n'oublie pas les thésards qui ont partagé beaucoup de moments avec moi, au cours de nos soirées ou des journées de l'ED : Elsa, Marie-Thérèse, Romain, Flo & Flo, Aurore, Dienaba, Pierre, Lucille, Nicolas, ...*

*J'ai une pensée toute particulière pour tous mes « loups ». Merci pour votre soutien sans faille pendant les périodes difficiles et d'avoir été là pour partager les moments joyeux. On dit qu'un homme est chanceux lorsqu'il a un ami sur qui il peut compter en toutes circonstances. J'ai le bonheur d'avoir « une meute » entière qui m'entoure et il n'existe pas de mot pour décrire ce que je ressens à votre contact. Vous êtes une deuxième famille pour moi.*

*Merci à Alex (ma « sœur jumelle » et notre petite fée) pour tout ces instants complices (pero réveille-toi !). Bonne chance pour ta thèse. Merci à Julie (ma « grande sœur ») pour ta présence discrète et rassurante, peu de personnes possèdent ton don pour apaiser les gens. Merci à Aurélie (ma « petite mère ») pour ta gentillesse et ta bonté, je sais que je te dois beaucoup. Merci à Camille (ma « petite sœur »), pour avoir partagé le quotidien du « trio infernal » et pour avoir combattu « le dragon » à mes côtés lorsque c'était nécessaire. Merci à Jo ( Dr Logan pour les intimes) pour avoir été un binôme hors pair, fondateur de la CCBRG et pour être celui qui nous donne toujours l'envie d'avancer (prends garde, à force d'avancer comme ça tu vas finir sur Pluton et le pire c'est qu'on t'y suivra avec plaisir !). Enfin, merci à Eric (« mon Frère ») pour m'avoir aidé à grandir depuis si longtemps (fendage de « main à une bois »), avoir « fondé » la meute à mes côtés et pour m'avoir appris que nos seules limites étaient celles de notre volonté. Je garde un œil sur toi vieux loup ! Les choses n'auraient pas été pareilles sans vous tous et je n'aurais jamais eu la force de m'embarquer dans cette aventure.*





Merci à « l'équipe de Bagneux » et à « l'équipe de Saint-Arnoult » pour tous les moments passés (J'ai bien retenu que « les stats sont l'œuvre du Malin et ça nous veut du mal ! »)

Merci à ceux qui m'ont donné envie de faire de la science, puis de la recherche. Je pense en particulier à José Lebreton, chercheur en physique. Je me souviens lorsque tu nous (Eric et moi) as expliqué que le goût ferreux du sang provenait des atomes de fer présent dans les hèmes de l'hémoglobine. J'étais simplement en 1<sup>ère</sup> mais tu m'as donné envie de faire de la recherche car t'écouter était passionnant. Je ne pensais pas qu'un homme pouvait posséder tant de savoir. Merci à mes anciens profs de lycée. En particulier, M. Cénac qui m'a donné envie de faire de la science en nous montrant le fameux « jardin magique de papy Cénac » pendant le club science de 5<sup>ème</sup>. Vous avez dit un jour que je pourrais aller loin alors je suis parti pour voir. Merci pour tout.

Merci aussi à Arlette et à Grégory pour votre aide, d'avoir été là pour m'écouter lorsque je doutais de moi. Vous m'avez donné l'énergie d'avancer lorsqu'il fallait que je repousse mes limites.

Enfin, je tiens à remercier les personnes les plus importantes à mes yeux. Merci à ma famille qui m'a soutenu tout le long, qui ne m'a jamais abandonné même quand je partais loin, très loin dans mes délires. Merci à mes parents de m'avoir toujours fait confiance. Vous m'avez toujours soutenu et protégé, contre vents et marées. C'est grâce à vous et aussi pour vous que j'ai été si loin. Merci de m'avoir parfois poussé en avant, C'est vous qui avez fait de moi ce que je suis aujourd'hui et pour ça, mille fois merci. Merci à mon frère Ludovic. Merci d'être toujours là pour moi et pour toutes nos discussions. Même si je n'en ai pas forcément l'air, je prête toujours une oreille attentive à tes conseils. C'est aussi toi qui as « ouvert la voie » vers la science et la bio. Merci pour tout ça. Je vous aime.



*Pour finir ces (longs) remerciements, je voudrais avoir une pensée pour mes grands parents. Vous êtes partis trop vite. Malgré le peu de temps que j'ai passé avec mon grand père, il m'a donné la force d'avancer et de me battre. Merci aussi à Ma Mamie pour m'avoir appris à aimer les gens, à me tempérer et pour tout le bonheur qu'elle nous a donné au cours de ces années. Tu voulais que j'aille loin, que je fasse de grandes études. C'est pour toi que je suis là. J'espère être à la hauteur de vos espoirs pour que vous puissiez être fiers de moi.*

*A toutes les personnes citées ici et à toutes celles que je ne pouvais pas noter faute d'écrire une autre thèse sur vous tous, je veux vous dire un million de mercis et vous exprimer toute ma gratitude. Je sais que je vous dois tout.*

*Cette thèse est aussi et avant tout la vôtre.*



# Sommaire

<b>Liste des figures .....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>13</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>15</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>23</b>
I Le modèle <i>Astyanax</i> .....	23
I.1 Origines des populations cavernicoles.....	25
I.2 Comparaison morphologique des morphotypes.....	31
I.2.1 La perte de l'œil .....	31
I.2.2 La perte de la pigmentation.....	33
I.2.3 Modification du squelette cranio-facial. ....	37
I.2.4 Le système gustatif.....	39
I.2.5 La ligne latérale et les neuromastes .....	39
I.2.6 Le système olfactif.....	41
I.2.7 Modification du métabolisme .....	43
I.3 Notions de développement chez les vertébrés et les poissons téléostéens.....	45
I.3.1 Le développement précoce du système nerveux.....	45
I.3.2 La régionalisation du système nerveux est sous l'influence de voies de signalisation.....	49
I.3.3 Modulations développementales chez les <i>Astyanax</i> cavernicoles. ....	55
I.3.3.1 La perte des yeux .....	55
I.3.3.2 Modifications de la régulation des voies de signalisation et leurs conséquences.....	57
I.4 Les outils utilisables chez les <i>Astyanax</i> .....	63
I.4.1 Outils pour les analyses développementales.....	63
I.4.2 Les outils génétiques.....	67
I.4.3 Les outils transcriptomiques .....	69



II Le comportement animal .....	71
II.1 Quelques éléments d’histoire de la biologie du comportement et de l’éthologie.....	71
II.1.1 Définitions d’un comportement.....	71
II.1.2 Evolution de l’étude du comportement .....	73
II.1.2.1 L’étude du comportement dans le monde antique : Aristote et le mentalisme .....	75
II.1.2.2 Descartes et le dualisme .....	77
II.1.2.3 Darwin et le matérialisme.....	79
II.1.2.4 L’évolutionnisme.....	81
II.1.2.5 Le behaviorisme .....	83
II.1.2.6 Le cognitivisme .....	85
II.1.2.7 La réflexologie.....	87
II.1.2.8 Le conditionnement Skinnerien.....	89
II.1.2.9 La confrontation de l’inné et de l’acquis.....	91
II.1.2.10 L’éthologie.....	93
II.1.2.11 Ecologie comportementale .....	97
II.2 Lien entre l’évolution et le comportement .....	101
II.3 Exemples de comportement chez les poissons .....	103
II.3.1 Comportement migratoire.....	103
II.3.2 Comportement social .....	107
II.3.3 Comportement alimentaire .....	115
II.3.4 Comportement sexuel .....	121
II.3.5 Intérêts sanitaires et pharmaceutiques de l’étude du comportement .....	127
II.4 Le modèle <i>Astyanax mexicanus</i> et la biologie du comportement.....	131
II.4.1 Le comportement de nage.....	131
II.4.2 L’attraction par les vibrations.....	133
II.4.3 Le rythme circadien .....	135
II.4.4 Le comportement agressif .....	137
II.4.5 Le comportement alimentaire.....	139





<b>Résultats et discussions .....</b>	<b>143</b>
I Evolution du comportement agressif et du système sérotoninergique.....	143
I.1 Présentation des articles .....	143
I.2 Publications des travaux .....	147
Evolutionary Shift from Fighting to Foraging in Blind Cavefish through Changes in the Serotonin Network .....	149
Feed or fight: A behavioral shift in blind cavefish.....	187
I.3 Discussion .....	197
II Evolution des systèmes aminergiques chez le poisson aveugle <i>Astyanax Mexicanus</i> ...	205
II.1 Présentation .....	205
II.2 Travaux en cours de préparation .....	211
Reduced monoamine oxidase activity and a hyper-monoaminergic phenotype in the brain of the blind cavefish <i>Astyanax mexicanus</i> .....	213
II.3 Discussion.....	263
III. Mise en place des méthodes de transgénèse chez l' <i>Astyanax mexicanus</i> .....	269
III.1 Présentation .....	269
III.2 Matériels et méthodes.....	275
III.3 Résultats et discussions .....	277
III.3.1 Vecteur de pDEST-GFP (promoteur $\beta$ cristalline-CFP) .....	277
III.3.2 Vecteur pDEST-ZAM (promoteur actine cardiaque-RFP) .....	281
III.3.3 Comparaison de l'utilisation de la méganucléase <i>I-SceI</i> et de la transposase <i>Tol2</i> .....	283
III.4 Conclusion.....	285
 <b>Conclusions et perspectives .....</b>	 <b>287</b>
 <b>Bibliographie.....</b>	 <b>295</b>
 <b>Annexe .....</b>	 <b>331</b>
A Developmental Staging Table for <i>Astyanax mexicanus</i> Surface Fish and Pachón Cavefish .....	331
 <b>Résumé .....</b>	 <b>357</b>



# Liste des figures

Figure 1 : Le comportement à différentes échelles : .....	18
Figure 2 : Présentation de l' <i>Astyanax mexicanus</i> .....	22
Figure 3 : Position phylogénétique de l' <i>Astyanax mexicanus</i> .....	22
Figure 4 : Origine des populations cavernicoles .....	24
Figure 5 : Morphologie d'alevins hybrides .....	28
Figure 6 : Exemples d'espèces cavernicoles. ....	28
Figure 7 : Tableau descriptif des caractères constructifs et régressifs des populations cavernicoles. ....	30
Figure 8 : Dégénérescence de l'œil chez le poisson cavernicole.....	32
Figure 9 : La pigmentation. ....	34
Figure 10 : Modifications cranio-faciales entre les populations et après les transplantations de cristallin. ....	36
Figure 11 : Les papilles gustatives des <i>Astyanax mexicanus</i> . ....	38
Figure 12 : Les neuromastes et leurs répartitions chez le poisson zèbre. ....	40
Figure 13 : Système olfactif des <i>Astyanax mexicanus</i> . ....	40
Figure 14 : Changement de la consommation d'oxygène en période de jeûne. ....	42
Figure 15 : La formation du tube neural. ....	44
Figure 16 : Développement du système nerveux central à partir d'un tube. ....	46
Figure 17 : Système du drapeau français. ....	48
Figure 18 : Les centres de signalisation et la régionalisation du tube neural. ....	50
Figure 19 : L'organisateur mi-diencephalique et le développement du thalamus. ....	52
Figure 20 : Signalisation induisant la formation des neurones sérotoninergiques dans le raphé. ....	54
Figure 21 Chronologie du développement du cerveau antérieur des vertébrés. ....	54
Figure 22 : La perte des yeux chez les cavernicoles. ....	56
Figure 23 : Extension du territoire d'expression de <i>Shh</i> chez les CF. ....	58



Figure 24 : Effets pléiotropiques de <i>Shh</i> et de <i>Prox1</i> . .....	58
Figure 25 : Elargissement de l'hypothalamus chez les CF. ....	60
Figure 26 : Comparaison du développement des SF et des CF. ....	62
Figure 27 : Exemple d'analyse QTL : le gène <i>Mcr1</i> . ....	66
Figure 28 : Schéma représentant l'histoire de l'éthologie et ses nœuds d'organisation. ....	72
Figure 29 : Extrait du <i>Traité de l'Homme</i> de Descartes.....	76
Figure 30 : Exemples de tests étudiant la localisation spatiale. ....	84
Figure 31 : Comportement inné et acquis. ....	88
Figure 32 : Comportement acquis en milieu naturel : cas de la mésange. ....	90
Figure 33 : Comportement nuptial du grèbe huppé. ....	94
Figure 34 : Konrad Lorenz. ....	94
Figure 35 : Tableau comparatif de l'éthologie et de l'écologie comportementale. ....	98
Figure 36 : Evolution des comportements et sélection naturelle. ....	100
Figure 37 : La phalène du bouleau, un exemple de l'impact environnemental sur la fréquence allélique. ....	102
Figure 38 : Migrations saisonnières des thons dans l'Atlantique. ....	104
Figure 39 : Cycle de vie et migration des saumons. ....	104
Figure 40 : Origine hypothétique des flux migratoires actuels. ....	106
Figure 41 : Formation auto-organisée dans un banc de poissons. ....	106
Figure 42 : Interactions entre les individus au sein du banc. ....	108
Figure 43 : Apprentissage de la reconnaissance du banc chez le poisson zèbre. ....	110
Figure 44 : Comportement social de l'épinoche. ....	112
Figure 45 : Phase de reproduction et coloration des cichlidés mâles <i>Haplochromis burtoni</i> . .....	114
Figure 46 : le barracuda <i>Sphyraena barracuda</i> en période de chasse. ....	114
Figure 47 : Le poisson archer <i>Toxotes jaculatrix</i> : une technique de chasse atypique. ....	116
Figure 48 : Le système du « self-feeder ». ....	118



Figure 49 : Parade nuptiale de l'épinoche à trois épines. ....	120
Figure 50 : Adaptation morphologique des tétras porte-épées mâles <i>Corynopoma riisei</i> pour le comportement reproducteur. ....	122
Figure 51 : Variation de la coloration des mâles <i>Pundamilia pundamilia</i> et <i>Pundamilia nyererei</i> . ....	124
Figure 52 : Catégories de soins parentaux existant chez les poissons. ....	124
Figure 53 : Soins parentaux des tilapias à gueules rouges : l'incubation buccale. ....	126
Figure 54 : Conséquences morphologiques, développementales et comportementales d'une exposition à des composés neurotoxiques. ....	128
Figure 55 : Comportement de nage en banc des SF. ....	130
Figure 56 : Le « wall following » des CF. ....	132
Figure 57 : Attraction des CF par les vibrations. ....	134
Figure 58 : Le sommeil des SF et des CF. ....	136
Figure 59 : Agressivité des <i>Astyanax</i> . ....	138
Figure 60 : Comportement de recherche alimentaire des <i>Astyanax</i> . ....	140
Figure 61 : Le système sérotoninergique du poisson zèbre. ....	206
Figure 62 : Localisation des systèmes aminergiques chez le poisson zèbre. ....	208
Figure 63 : Carte des vecteurs utilisés chez l' <i>Astyanax</i> . ....	270
Figure 64 : Méthode de transgénèse utilisant les méganucléases. ....	272
Figure 65 : Les méthodes de transgénèse utilisant les transposons. ....	274
Figure 66 : Expression du vecteur pDEST-GFP ( $\beta$ cristalline CFP) chez le SF. ....	276
Figure 67 : Expression du vecteur pDEST-ZAM (actine cardiaque-RFP) chez le CF. ....	280
Figure 68 : Récapitulatif des injections des vecteurs et des techniques de transgénèse chez les SF et les CF. ....	284





# Liste des abréviations

5HIAA	Acide 5-hydroxyindolacétique
5HT	5-hydroxytryptamine (ou sérotonine)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire.
ANR	Bourellet neural antérieur (abréviation de Anterior Neural Ridge)
AP	Axe antéro-postérieur
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Bmp	Gènes <i>Bone Morphogenesis Protein</i>
CF	Poisson cavernicole (abréviation de CaveFish)
CFP	Protéine fluorescente bleue (abréviation de Cyan Fluorescent Protein)
CMZ	Zone marginale ciliaire (abréviation de Ciliary Marginal Zone)
DBH	Dopamine $\beta$ hydroxylase
DOPAC	Acide 3,4 dihydroxyphényl acétique
DV	Axe Dorso-ventral
F0	Individu fondateur / injecté
F1	Première génération
F2	Deuxième génération
F3	Troisième génération
Fgf	Gènes <i>Fibroblast Growth Factor</i>
HH	Gène de la famille <i>Hedgehog</i>
Hpf	Heures post fécondation
HPLC	High pressure liquid chromatography
HVA	Acide homovanillique
IsO	Organisateur isthmique (aussi appelé Midbrain Hindbrain Boundary)
LTR	Long Terminal Repeat
MAO	Monoamine oxydase
MDO	Mid-Diencephalic Organizer
MHB	Midbrain Hindbrain Boundary
NPY	Neuropeptide Y
PCB	Polychlorobiphényles
PNMT	Enzyme phényléthanolamine N-méthyltransférase
QTL	Locus à caractère quantitatif (abréviation de Quantitative Trait Loci)
RFP	Protéine fluorescente rouge (abréviation de Red Fluorescent Protein)
SF	Poisson de surface (abréviation de Surface Fish)
VAB	Vibration attractory behavior
VMA	Acide vanillyl-mandélique
ZLI	Zona Limitans Intrathalamica



# Introduction générale

Cette thèse est centrée sur l'étude du comportement animal. La définition donnée par le dictionnaire Larousse pour le mot « comportement » est « *l'ensemble des réactions d'un organisme qui agit en réponse à une stimulation venue de son milieu intérieur ou du milieu extérieur et observables objectivement* ». Bien que nous ayons l'habitude de penser que le comportement nécessite des facultés cognitives et intellectuelles particulières, cette idée n'est pas totalement vraie. Tout dépend de l'échelle à laquelle nous l'observons.

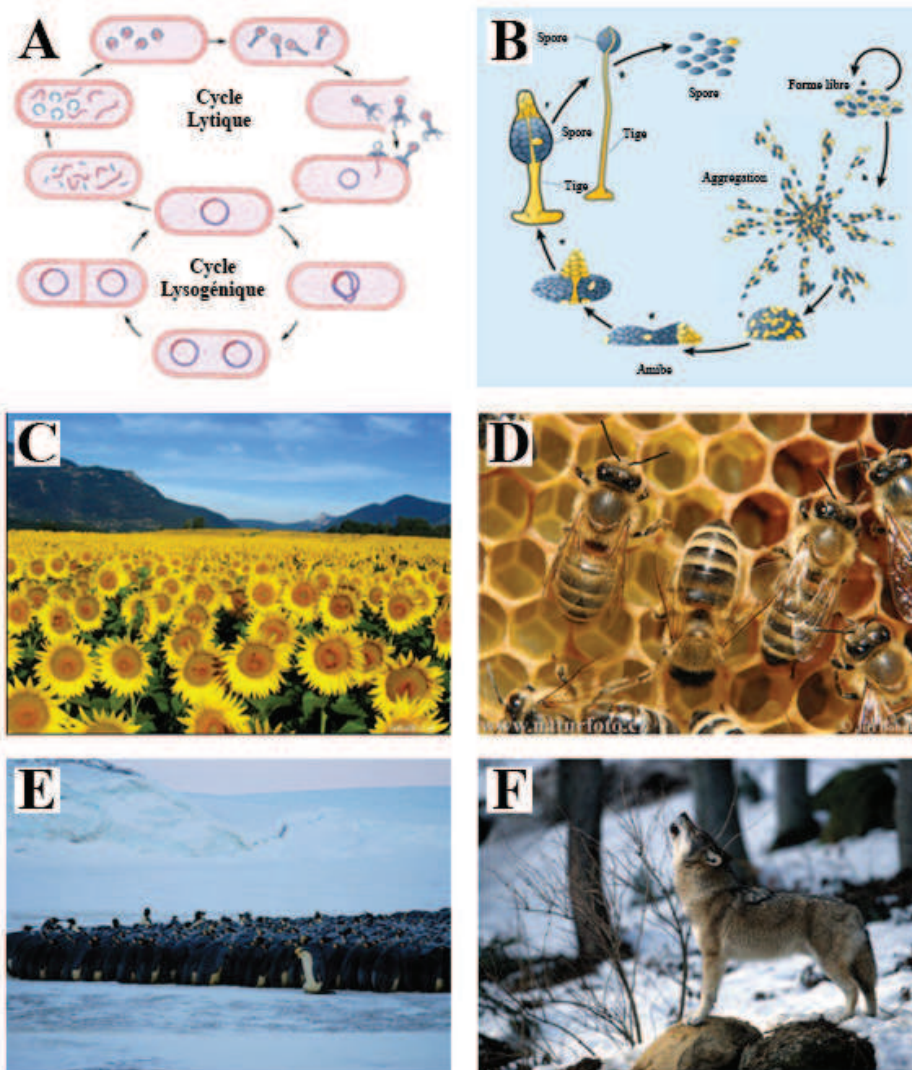
Certains « comportements » peuvent être observés chez les virus, des entités dont la classification sous le terme d'organisme vivant fait débat au sein de la communauté scientifique car ils sont incapables de se reproduire seuls. Lorsque le virus infecte une cellule, deux cycles sont possibles : le cycle lytique, où le virus intègre son information génétique au génome de la cellule puis détourne le fonctionnement de la machinerie cellulaire pour se reproduire jusqu'à destruction de l'hôte ; et le cycle lysogénique, où le virus intègre son information génétique au génome de la cellule puis reste latent jusqu'à l'apparition d'un stress cellulaire ou indéfiniment. Dans cette dernière possibilité, le virus protège la cellule contre une autre infection virale d'une même souche et la cellule copie l'information virale pendant les divisions cellulaires. Certaines études ont montré que les phages, des virus infectant des bactéries, réalisent préférentiellement des cycles lytiques ou lysogéniques en fonction de la concentration de bactéries présente dans le milieu. Selon le système « killing the winner », les phages réalisent préférentiellement un cycle lytique lorsque la population bactérienne est importante.



De même, on parle fréquemment de « comportement » au niveau cellulaire. « *Au début il n'y avait pas de barrière entre nous et nous nous comportions comme un tout. Une fois connues nos positions, nous avons éclaté en différents groupes et dès lors, nous n'avons parlé qu'aux membres de notre groupe* ». Hors de son contexte, on pourrait croire que cet extrait tiré de (Wolpert et al., 2004) parle de groupes sociaux mais en réalité il s'agit de cellules au cours des étapes de développement très précoces d'un organisme. Pour citer brièvement d'autres exemples, on définit fréquemment les cellules cancéreuses comme des cellules ayant un « comportement anarchique et prolifératif important », ou encore on parle du comportement des cellules du système immunitaire au cours d'une infection ou d'un épisode allergique.

Certains « comportements » sont observés au sein du règne végétal. Par exemple, de nombreuses plantes réagissent aux attaques d'insectes herbivores, comme la chenille, en sécrétant du salicylate de méthyle qui attirera les guêpes parasitoïdes *Diadegma semiclausum*, prédateurs naturels des chenilles. De même, je pourrais citer de nombreux autres exemples de comportements des végétaux, du mouvement giratoire des tournesols pour suivre la course du soleil aux comportements de prédation de certaines plantes carnivores.

Cependant, il est vrai que la majorité des comportements que nous avons l'habitude d'observer se déroulent au sein du règne animal. Pour illustrer mon propos, je citerai quelques exemples qui existent chez les canidés. Qui n'a jamais entendu parler du comportement des renards *Vulpes vulpes* qui, de nuit, venaient visiter les poulaillers pour tuer et emporter quelques volailles ? Ce comportement est à l'origine de l'expression française « être un voleur de poule ». De même, le loup *Canis lupus*, bien que craint (et n'étant finalement pas si grand et méchant), est un animal remarquable par sa nature sociable et l'organisation hiérarchique de la meute. Cette hiérarchie comprend un mâle et parfois une femelle dominante (alpha) accompagné de quelques animaux subordonnés (béta) qui eux-mêmes dominent d'autres individus (oméga), qui sont de véritables souffres douleurs. La taille d'une meute peut aller du couple à une trentaine d'animaux. Cette organisation permet d'augmenter le taux de survie, entre autres en permettant une meilleure protection des jeunes. Elle permet également d'augmenter le nombre de proies potentielles, une meute pouvant attaquer un animal bien plus grand grâce à la force du nombre et à la cohésion du groupe.



**Figure 1 : Le comportement à différentes échelles :**

(A) Description des cycles lytiques et lysogéniques lors de l'infection d'une bactérie par un phage. En fonction des conditions environnementales, les phages réaliseront préférentiellement un cycle par rapport à l'autre. (B) Cycle de vie de *Dictyostelium discoideum*. Lorsque la nourriture est abondante, *Dictyostelium* est sous sa forme libre (solitaire) et se multiplie par division cellulaire. En cas de carence du milieu, les cellules se regroupent et forment une structure pluricellulaire de "limace" qui va se déplacer pour s'éloigner de la zone de carence. Les cellules se différencient encore pour former une structure tige/fruit qui éclatera afin de propager dans les airs des *Dictyostelium* sous forme de spores. Ceux-ci coloniseront un autre milieu et le cycle recommencera. (C) Comportement des fleurs de tournesol *Helianthus annuus*. (D) Comportement social de l'abeille *Apis mellifera*. Les butineuses communiquent entre elles dans la ruche pour indiquer la localisation des sources de nourriture ainsi que des dangers potentiels. Pour cela, l'abeille réalise une "danse" pendant que les autres l'observent. (E) Mâles de manchots empereurs *Aptenodytes forsteri* pendant l'incubation. Après la ponte de l'œuf, la femelle a besoin d'aller pêcher. Le mâle incube l'œuf sur ses pattes pour isoler l'œuf du froid du sol. Pour se protéger du vent glacé, le groupe adopte la formation dite de la "tortue". Il s'agit d'un exemple de thermorégulation comportementale. (F) Le loup *Canis lupus* est un animal sociable. L'un de ses moyens de communication est le chant. Cela permet, entre autres, de renforcer la cohésion du groupe, de rentrer en contact avec d'autres meutes vivant à plusieurs kilomètres et de prévenir d'éventuels intrus qu'ils pénètrent sur le territoire d'une famille.

Source : (A) [www.desktopclass.com](http://www.desktopclass.com) ; (B) [www.ssaft.com](http://www.ssaft.com) ; (C) [www.fond-ecran-image.com](http://www.fond-ecran-image.com) ; (D) [www.naturephoto-cz.com](http://www.naturephoto-cz.com) ; (E) [www.ens-lyon.fr](http://www.ens-lyon.fr) ; (F) [www.ferus.fr](http://www.ferus.fr)

Dans ce manuscrit, je ne parlerai que du comportement des animaux, ce qui est déjà un domaine vaste et complexe, en permanente évolution. Ce sont ces comportements qui, assez naturellement, ont toujours intéressé l'être humain. Dès la préhistoire, connaître les habitudes des animaux permettait déjà aux hommes des cavernes d'avoir plus de chance de manger tout en évitant d'être mangé. Encore aujourd'hui, cet héritage existe. Ainsi vous n'hésiteriez pas à vous approcher d'une biche alors qu'au contraire vous éviteriez un cobra, pourtant beaucoup plus petit.

Il ne faut pas voir le comportement comme un caractère fixe et figé car celui-ci évolue non seulement avec l'âge de l'individu mais aussi en même temps que l'espèce. L'homme l'a bien vite compris en domestiquant les animaux. Très rapidement, le chien *Canis lupus familiaris*, se comportant comme « le meilleur ami de l'homme », a pu prendre différentes fonctions. Grâce aux sélections des reproducteurs réalisées par l'homme, il devint une aide précieuse pour la chasse, passa de principal prédateur des troupeaux à gardien, avant de devenir également animal de compagnie. Leur évolution continue aujourd'hui avec la sélection de nouvelles variétés présentant des caractères comportementaux et morphologiques particuliers. Pour donner un exemple contemporain, ils servent aujourd'hui à la formation de groupes cynophiles pour la recherche de personnes perdues dans les avalanches, ou encore à rechercher de la drogue. Ici, non seulement les « races » et les individus ont été sélectionnés mais en plus ils sont entraînés depuis leurs plus jeunes âges afin d'accroître certains traits comportementaux. Pour illustrer ce propos avec une autre espèce, l'homme a sélectionné des chevaux (*Equus caballus*) paisibles et puissants pour tracter les charges lourdes (les chevaux de trait), d'autres pour leur rapidité à la course bien que souvent au détriment de leur « caractère » (comme les pur-sang arabes) ou à l'inverse ont sélectionné des animaux pour leur agressivité et leur témérité (les chevaux de guerre).



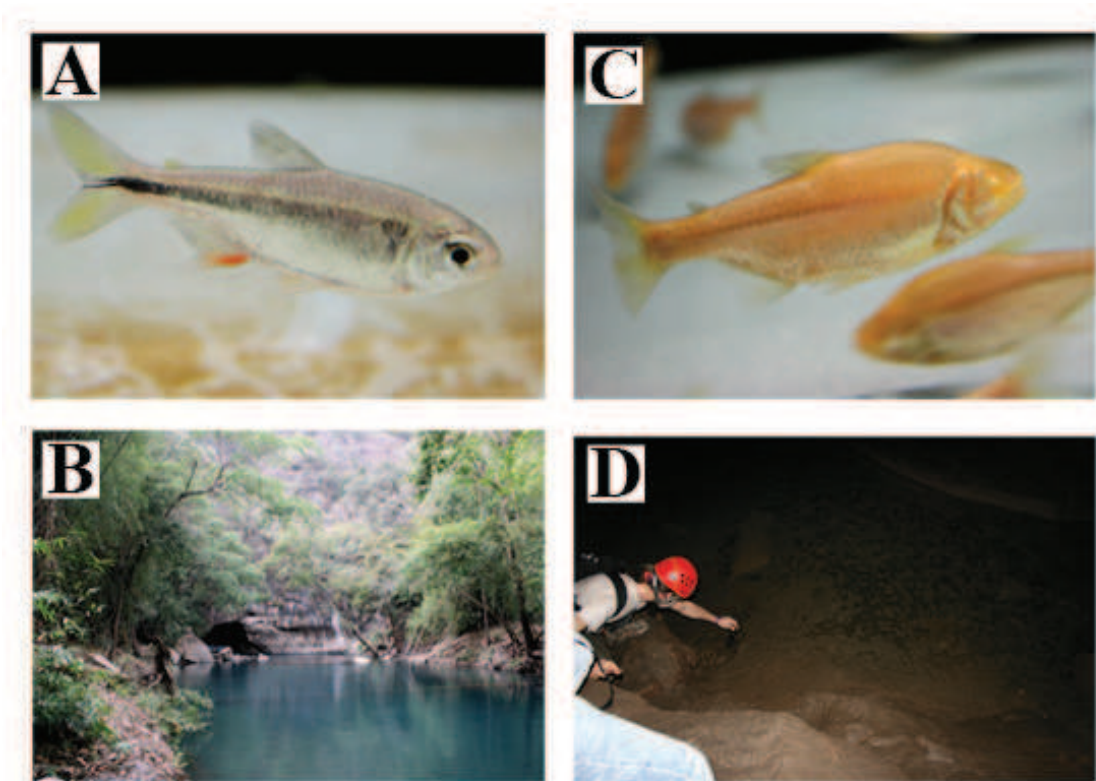


A coté de cet intérêt général des hommes, certains chercheurs ont voulu étudier plus en détail le « comportement animal ». Tout comme Mendel qui travailla sur les petits pois pour comprendre les principes de l'hérédité, de nombreuses personnes ont étudié différentes espèces modèles pour comprendre les tenants et aboutissants du comportement, quoi que bien souvent dans le but d'appliquer directement les résultats de leurs recherches sur le comportement humain. Aujourd'hui, grâce au développement des biotechnologies, les études du comportement sont à l'aube de grandes avancées. Là où Pavlov étudiait la mise en place des réflexes conditionnels, nous sommes aujourd'hui capables à l'aide d'imagerie par résonance magnétique (IRM fonctionnel) d'observer les régions cérébrales activées voire les neurones entrant en jeu lors de la mise en œuvre de ces comportements, ou même, grâce à l'optogénétique, de télécommander des circuits neuronaux spécifiquement sélectionnés et d'observer l'effet de certaines activations sur le comportement.

Mon projet de thèse ne concerne pas l'évolution du comportement suite à la sélection façonnée par la main de l'homme. Au contraire, il concerne le comportement de populations des poissons *Astyanax mexicanus* qui, suite à des événements géologiques et biologiques, ont évolué afin de s'adapter à la vie cavernicole.

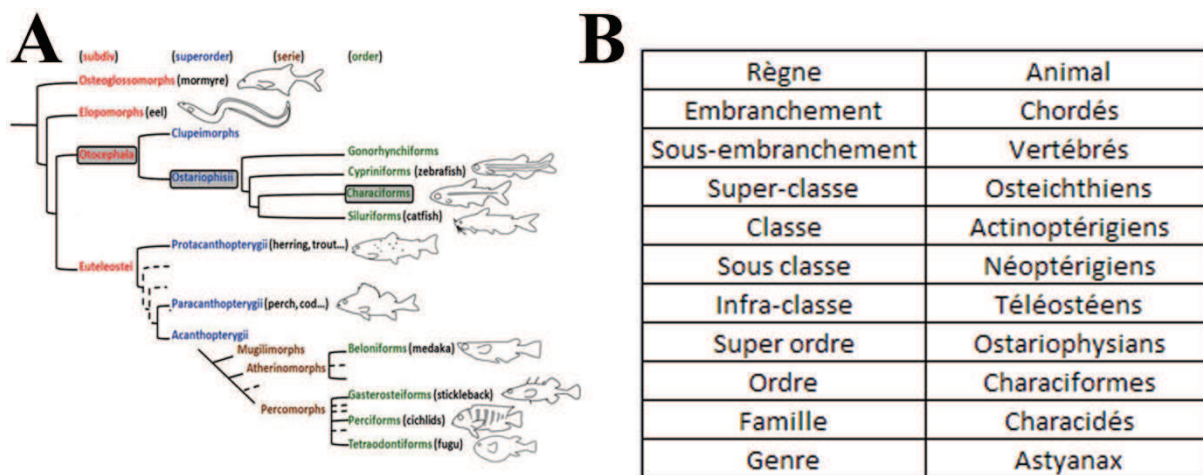
Le premier chapitre de l'introduction présentera le poisson *Astyanax mexicanus*, modèle d'étude de ce projet. Vous y découvrirez les origines des différentes populations ainsi que les différences à la fois morphologiques et développementales qui existent entre elles. Les outils méthodologiques qui ont été développés sur cette espèce seront également détaillés.

Le deuxième chapitre discute l'origine des études du comportement animal et l'évolution de la pensée humaine sur ce sujet depuis l'antiquité jusqu'à nos jours. Les modèles « poissons » permettant l'étude du comportement ainsi que les travaux réalisés précédemment sur *l'Astyanax* dans ce domaine seront présentés.



**Figure 2 : Présentation de l'*Astyanax mexicanus***

(A) *Astyanax* de surface et (B) son habitat naturel. (C) *Astyanax* cavernicole de la caverne Pachón et (D) son habitat naturel. La taille des poissons adultes est en moyenne de 7cm. D'après à partir de (Hinaux et al., 2011).



**Figure 3 : Position phylogénétique de l'*Astyanax mexicanus***

(A) Arbre phylogénétique des téléostéens. D'après (Hinaux et al., 2011). (B) Phylogénie de l'*Astyanax*

# Introduction

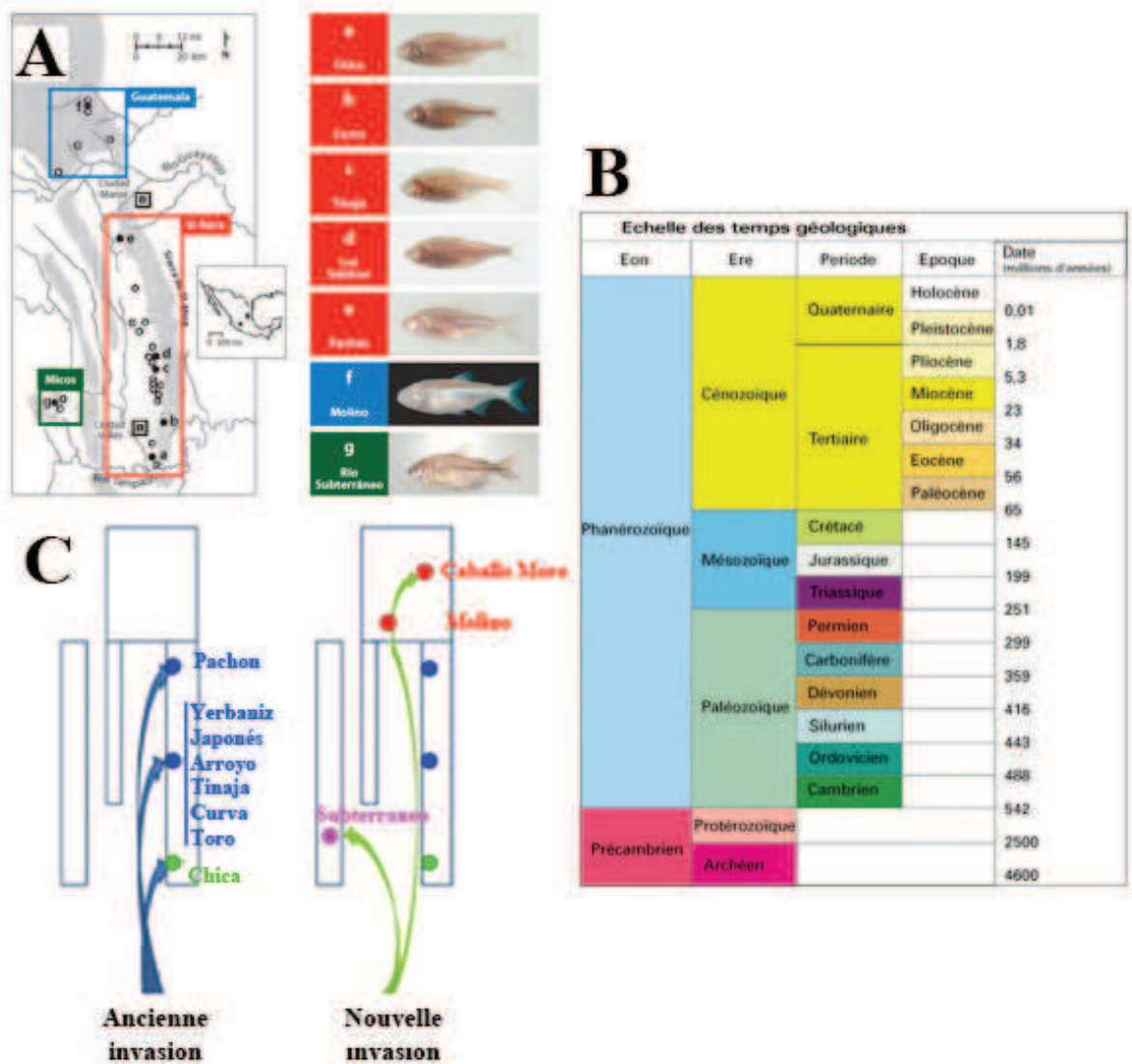
## I Le modèle *Astyanax*

Les travaux de ce projet ont été réalisés sur un poisson téléostéen characiforme : *Astyanax mexicanus*. Il s'agit d'un modèle animal de choix pour les études de développement et d'évolution. En effet, il existe au sein de cette espèce différentes populations.

On rencontre naturellement des populations d'*Astyanax mexicanus* dans les rivières d'Amérique Centrale (figure 2B). Ces poissons sont communément appelés les tétras mexicains. Cette population dite de surface (SF pour Surface Fish) est présentée figure 2A.

Cependant, il existe d'autres populations ou morphotypes plus atypiques. A l'heure actuelle, 29 populations cavernicoles (CF pour CaveFish) d'*Astyanax mexicanus* ont été découvertes. Elles vivent dans différentes cavernes et réseaux aquatiques souterrains de la région de la Sierra Del Abra, au Mexique (figure 2D) et sont toutes dépigmentées et dépourvues d'yeux (figure 2C).

Comme le montre l'arbre phylogénétique de la figure 3, le poisson modèle étudié le plus proche de l'*Astyanax* est le poisson zèbre *Danio rerio*. Ce dernier est un cypriniforme. Les characiformes et les cypriniformes ayant divergé il y a environ 100 à 200 millions d'années, le poisson zèbre est tout de même relativement éloigné de notre modèle (Briggs, 2005; Near et al., 2012; Peng et al., 2006) même si de nombreuses comparaisons et références entre eux sont très utiles.



**Figure 4 : Origine des populations cavernicoles**

(A) Carte de la région de la Sierra de El Abra au Mexique et localisation des cavernes où des populations d'*Astyanax mexicanus* ont été recensées. Les lettres a-g présentent la localisation de certaines grottes et du phénotype de ses habitants (Jeffery, 2009). (B) Echelle des temps géologiques pour référence. (C) Représentation schématique des chaînes montagneuses mexicaines et des deux invasions successives. Chaque rectangle est une représentation schématique d'une chaîne de montagne de la région de El Abra (Cf. la carte A). Figure modifiée à partir de (Bradic et al., 2012).

## I.1 Origines des populations cavernicoles

Il est important de savoir qu'à l'origine les populations cavernicoles et de surface sont issues d'une même population qui vivait en surface. Par ailleurs, certaines populations cavernicoles sont apparues suite à des événements indépendants (Bradic et al., 2012; Jeffery, 2001; Sadoglu, 1956; Strecker et al., 2004).

Les études phylogénétiques d'Espinasa et Borowsky supposent qu'il y a eu à l'origine au moins deux invasions des grottes : dans la région El Abra et la région Micos (cf. carte de la figure 4A). Les poissons se sont adaptés à la vie cavernicole et ont colonisé d'autres cavernes avoisinantes via les réseaux souterrains. Les subtiles différences phénotypiques existantes entre les populations d'une même région peuvent être expliquées par des événements de réhybridations avec des poissons de surface, la sélection naturelle induite par les environnements cavernicoles légèrement différents et l'accumulation de mutations génétiques. Par ailleurs, l'analyse des séquences microsatellites des populations Pachón, Tinaja et Curva (de la région El Abra) montre que ces populations ont une origine commune (Strecker et al., 2004). Il semblerait qu'au début du Pléistocène, période entre 1.8 millions d'années à 11 000 ans avant notre ère (figure 4B), les variations climatiques furent à l'origine de l'extinction des *Astyanax* de surface dans les régions mexicaines. Les CF, protégés dans les grottes, survécurent. A la fin de cette période glaciaire, les rivières furent de nouveau colonisées par des populations d'*Astyanax* de surface. Lors de cette recolonisation, des SF envahirent les cavernes de la région Guatemala.

Dans une récente étude présentée dans la figure 4C, Bradic propose l'existence d'au moins cinq événements de colonisation : trois événements indépendants dans la région El Abra réalisés avant le Pléistocène par les « anciennes » populations de SF et deux événements, dans la région Micos et Guatemala, réalisés par les populations actuelles de SF (Bradic et al., 2012). On estime ainsi que l'apparition des populations cavernicoles date de 100 000 ans à trois millions d'années (Strecker et al., 2004).

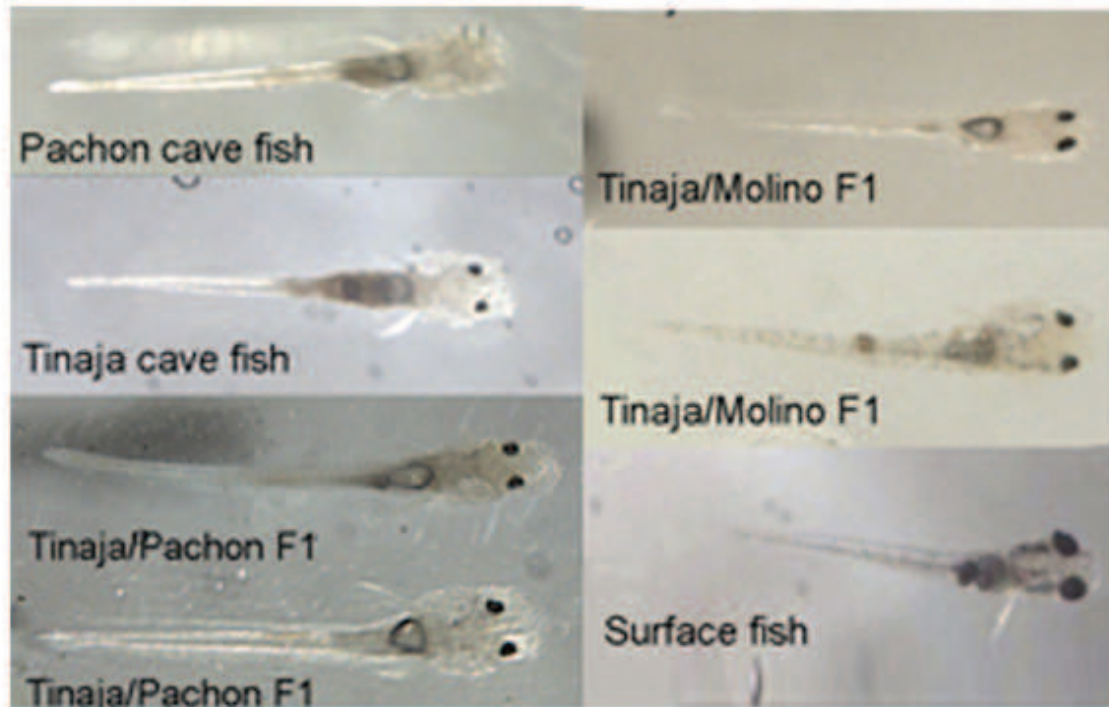


Le Mexique dispose d'un environnement favorable à l'apparition de la vie cavernicole car la géologie de ce pays, avec ses roches karstiques, possède de nombreuses cavernes et un réseau souterrain très développé. L'écoulement des rivières érode les sols avec le temps. On peut supposer qu'à certains endroits, l'érosion va user le sol au point de faire une brèche entre la surface et un souterrain. Ce phénomène provoque la formation de bassins et de rivières souterraines. Certains poissons, dont les *Astyanax*, ont pu donc être piégés sous terre. Certains ont réussi à survivre lorsque les conditions initiales le permettaient et ils ont fondé les populations cavernicoles actuelles.

La majorité des études de notre équipe est réalisée sur des cavernicoles provenant de la caverne El Pachón. Elle se situe dans la région d'El Abra et elle porte le nom du village le plus proche. La première visite répertoriée date de 1945. Le bassin principal dans lequel on trouve les CF est relativement grand (environ 50 mètre de long) et il est connecté à d'autres mares lorsque le niveau de l'eau augmente (pendant la saison des pluies et au début de la saison sèche). La température de l'eau est de 25,5°C. Récemment, la taille de la population des CF de cette caverne a été estimée à 2750 individus par VH Reynoso (Communication au congrès *Astyanax* international meeting, 2009). La source supposée de nourriture provient des fientes de l'importante colonie de chauve-souris abritée dans la grotte. De plus, lors d'une visite de la caverne en 2009, des débris de végétaux ont été trouvés. Ils sont probablement une autre source alimentaire.

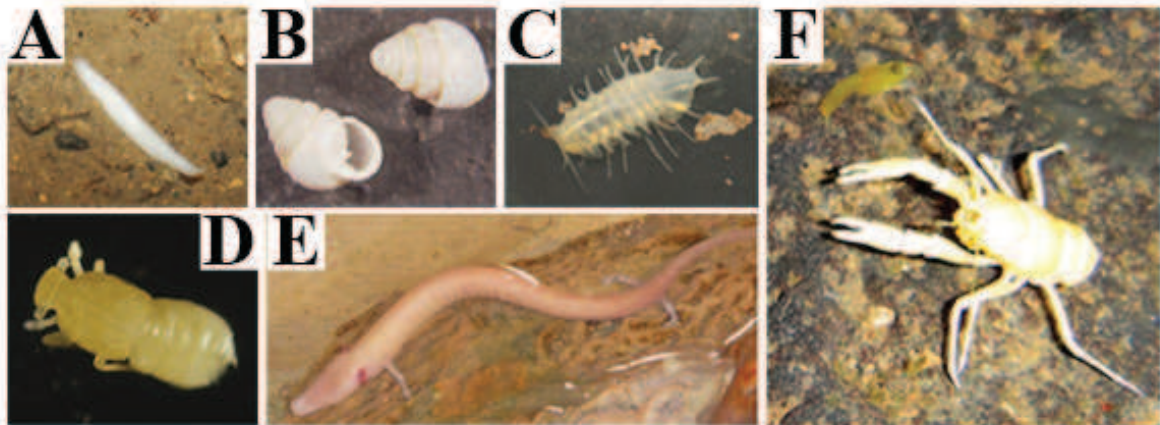
Nous avons aussi au laboratoire quelques individus CF provenant d'une autre caverne, la caverne Molino. Elle se situe dans une autre région, dans la Sierra de Guatemala. Lorsqu'il pleut l'eau ruisselante chargée de débris pénètre dans la caverne et alimente les bassins où les poissons ont été découverts. Nous possédons moins d'informations sur les conditions de vie des Molino car l'accès à cette grotte est difficile et demande des compétences en spéléologie importantes. De plus, il semblerait que cette population ne s'est jamais reproduite en laboratoire, elle constitue donc un modèle beaucoup plus difficile à travailler.





**Figure 5 : Morphologie d'alevins hybrides**

Photos d'alevins de CF, SF ou d'hybrides obtenus par le croisement de différentes populations cavernicoles. D'après (Borowsky, 2008a).



**Figure 6 : Exemples d'espèces cavernicoles**

La majorité des animaux vivants dans les cavernes sont aveugles et dépigmentés. C'est le cas de la planaire cavernicole (A), du mollusque cavernicole *Zospeum kusceri* (B), de l'isopode cavernicole *Monolistra bolei* (C), de la cicadelle cavernicole *Oliarus polyphemus* (D), l'urodèle cavernicole *Proteus anguinus* (E) et l'écrevisse cavernicole des grottes volcaniques de Lanzarote *Munidopsis polymorpha* (F). Figure modifiée à partir de (Jeffery, 2009)

Les vingt-neuf populations cavernicoles (CF) recensées sont toutes dépigmentées et aveugles, les yeux étant absents à l'âge adulte ou bien présents à l'état de vestiges. Leurs phénotypes morphologiques, bien que variant légèrement d'une population à l'autre, est relativement similaire entre les différentes cavernes (figure 4A). Les SF et les CF appartiennent à la même espèce *Astyanax mexicanus*. Bien que le terme d'espèce n'ait pas une définition qui fasse l'unanimité, il est généralement convenu que deux individus font partie d'une même espèce s'ils peuvent se croiser et donner une descendance viable et fertile. D'après cette définition, les différentes populations d'*Astyanax* appartiennent bien à une même espèce. En 1956 Sadoglu a montré pour la première fois qu'il est possible de croiser des CF et des SF et d'obtenir une descendance viable et fertile (Sadoglu, 1956).

De fait, le croisement de CF issus de populations différentes est aussi possible, et dans certains cas, permet la complémentation de certains caractères qui étaient pourtant perdus chez les parents. Par exemple, comme le montre la figure 5, les alevins obtenus après les croisements de CF Pachòn et de CF Tinaja ont des yeux fonctionnels, bien que légèrement plus petits que ceux de la population SF (Borowsky, 2008a). Cela permet également de démontrer que certaines populations cavernicoles ont bien des origines indépendantes les unes des autres.

Les vingt-neuf populations cavernicoles d'*Astyanax*, dont certaines sont d'origine indépendantes, présentent un phénotype similaire. En fait, dans tous les phyla, les animaux vivant en milieu souterrain exclusif sont tous aveugles et dépigmentés (vers, crevettes, araignées, amphibiens... Voir la figure 6). Il est donc probable qu'une pression de sélection forte favorise ces modifications dans un environnement cavernicole. Cette hypothèse sélectionniste est contestée et les détracteurs proposent que cette évolution soit due à de la dérive génétique. Darwin avait proposé en son temps que la disparition des yeux chez les animaux vivants dans l'obscurité soit due à leur non-usage. « *As it is difficult to imagine that eyes, although useless, could be in any way injurious to animals living in darkness, I attribute their loss wholly to disuse* », (Darwin, 1859) que l'on peut traduire par « *Comme il est difficile d'imaginer que les yeux, bien que non-utilisés, puissent être délétères aux animaux vivant dans l'obscurité totale, j'attribue leur disparition exclusivement à leur non-usage* ».

Feature	Change	Reference(s)
Larval jaw	Constructive	Figs. 2B, 2C
Maxillary teeth	Constructive	D. Stock (personal communication)
Taste buds	Constructive	Breder and Rasquin (1943); Schemmel (1967, 1974); Jeffery <i>et al.</i> (2000)
Cranial neuromasts	Constructive	Schemmel (1967); Teyke (1990); Jeffery <i>et al.</i> (2000)
Telencephalon	Constructive	Peters <i>et al.</i> (1993)
Eyes	Regressive	Cahn (1958); Zilles <i>et al.</i> (1983); Langecker <i>et al.</i> (1995)
Cornea	Absent	
Iris	Absent	
Anterior chamber	Absent	
Lens	Degenerate	
Posterior chamber	Absent	
Neural retina	Small and distorted	
RPE	Rudimentary	
Sclera	Small	
Optic nerve	Small degenerate	
Optic Tectum	Regressive	Voneida and Fish (1984); Peters <i>et al.</i> (1993)
Infraorbital Bones	Constructive	Breder (1944); Alvarez (1946); Jeffery and Yamamoto (2000)
Pineal Gland	Regressive (partial)	Omura (1975); Herwig (1976); but also see Tabata (1982)
Vertebrae	Regressive	Wilkens (1988)
Scales	Regressive	Wilkens (1988)
Pigmentation	Regressive	Breder and Rasquin (1943); Rasquin (1947); Wilkens (1970a); McCauley and Jeffery (2000)
Egg size (Yolk)	Constructive	Hüppop and Wilkens (1991)
Fat content	Constructive	Rose and Mitchell (1982)
Metabolism	Regressive	Hüppop (1986)

**Figure 7 : Tableau descriptif des caractères constructifs et régressifs des populations cavernicoles.**

D'après (Jeffery, 2001).

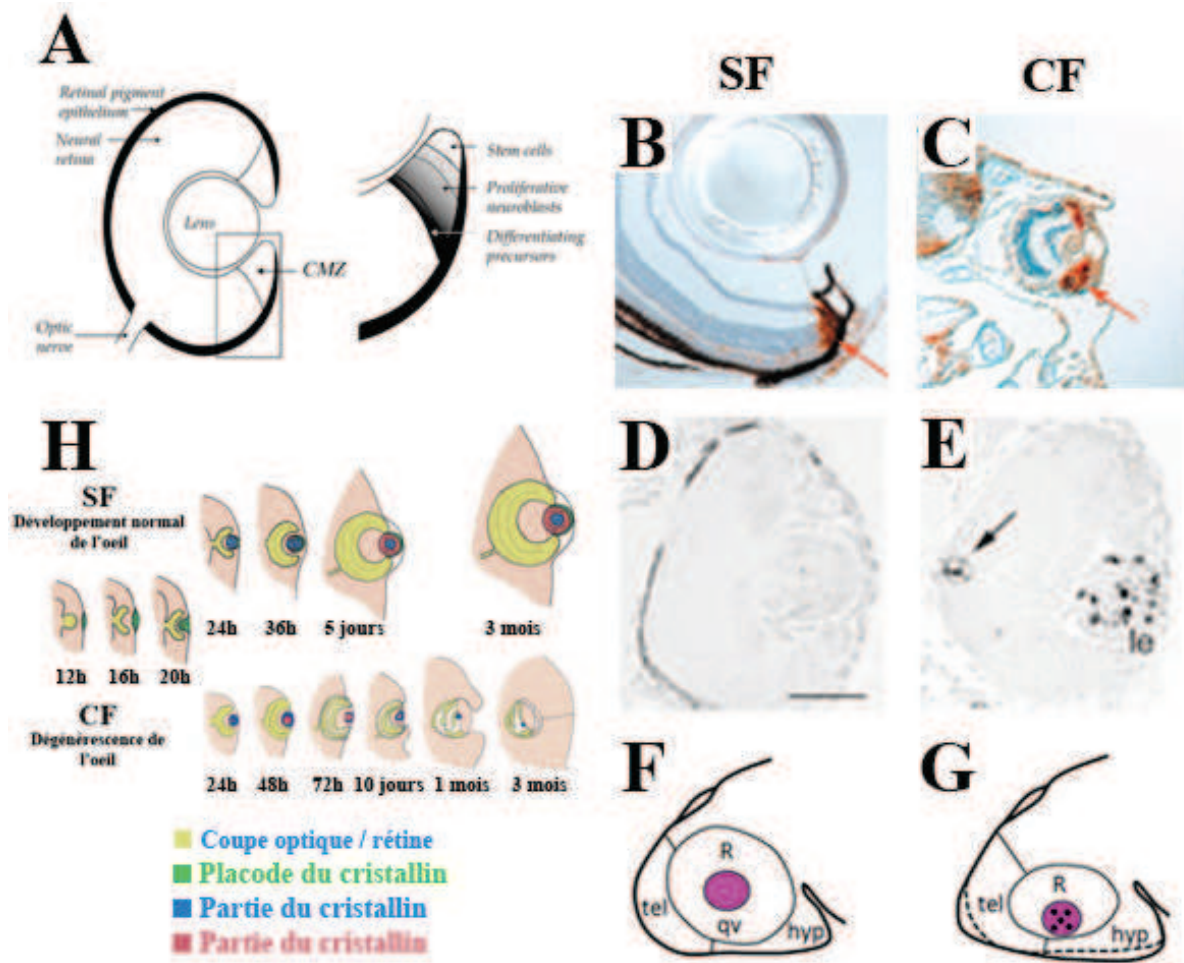
Malgré les pertes qu'ont subies les populations cavernicoles, il est important de ne pas considérer ces poissons comme une forme de vie « dégénérée ». D'une part, les CF dérivent de populations de SF. Les embryons CF présentent un œil (Jeffery, 2001), ce qui signifie qu'ils ont hérité des « gènes oculaires » de leurs ancêtres. Les SF et les CF dérivent donc tous d'une population d'*Astyanax* de surface et ils ont tous évolué depuis lors selon les contraintes de leur environnement propre. D'autre part, comme le montre le tableau de la figure 7, ces animaux n'ont pas seulement subi des « pertes », ils ont également réalisé de nombreux « gains » évolutifs afin de s'adapter au mieux à leur environnement. Ces modifications seront détaillées ci-dessous.

## **I.2 Comparaison morphologique des morphotypes**

### **I.2.1 La perte de l'œil**

Le caractère le plus marquant lorsqu'on observe un *Astyanax* cavernicole est certainement l'absence d'yeux (figure 1 et 4A).

Normalement, les yeux des vertébrés se développent à partir d'évaginations bilatérales du tube nerveux antérieur, les vésicules optiques. Au sein des vésicules optiques, les cellules proximales forment la tige optique et se différencieront en cellules gliales du nerf optique, tandis que les cellules distales forment deux couches de la cupule optique et se différencient plus tard en cellules neurales et en épithélium pigmenté de la rétine (figure 8). C'est également ce qui se passe chez l'*Astyanax* (Alunni et al., 2007). Chez les téléostéens et les amphibiens, les progéniteurs rétiniens multipotents sont réunis dans la zone marginale ciliaire (CMZ), dans la partie la plus antérieure de la rétine.



**Figure 8 : Dégénérescence de l'œil chez le poisson cavernicole.**

Anatomie générale d'un œil (A) (à gauche) et description de la zone de prolifération (A) (à droite). Marquage de la prolifération cellulaire par PCNA dans la CMZ (indiqué par la flèche orange) de SF (B) et de CF (C) (d'après Jeffery, 2009). Marquage de l'apoptose par TUNEL dans le cristallin et le nerf optique des CF (E) et non chez les SF (C) à 45hpf (Alunni et al., 2007). Schéma de la morphologie de l'œil des SF (F) et des CF (G) (Pottin et al., 2011). Schéma explicatif montrant le développement de l'œil des SF et des CF (H) (Jeffery, 2009).

Abréviations : télencéphale (tel), rétine (R), quadrant ventral (qv) hypothalamus (hyp)

Source de (A) : [www.umr8080.u-psud.fr/Retinogenesis/retinogenesis-research](http://www.umr8080.u-psud.fr/Retinogenesis/retinogenesis-research).

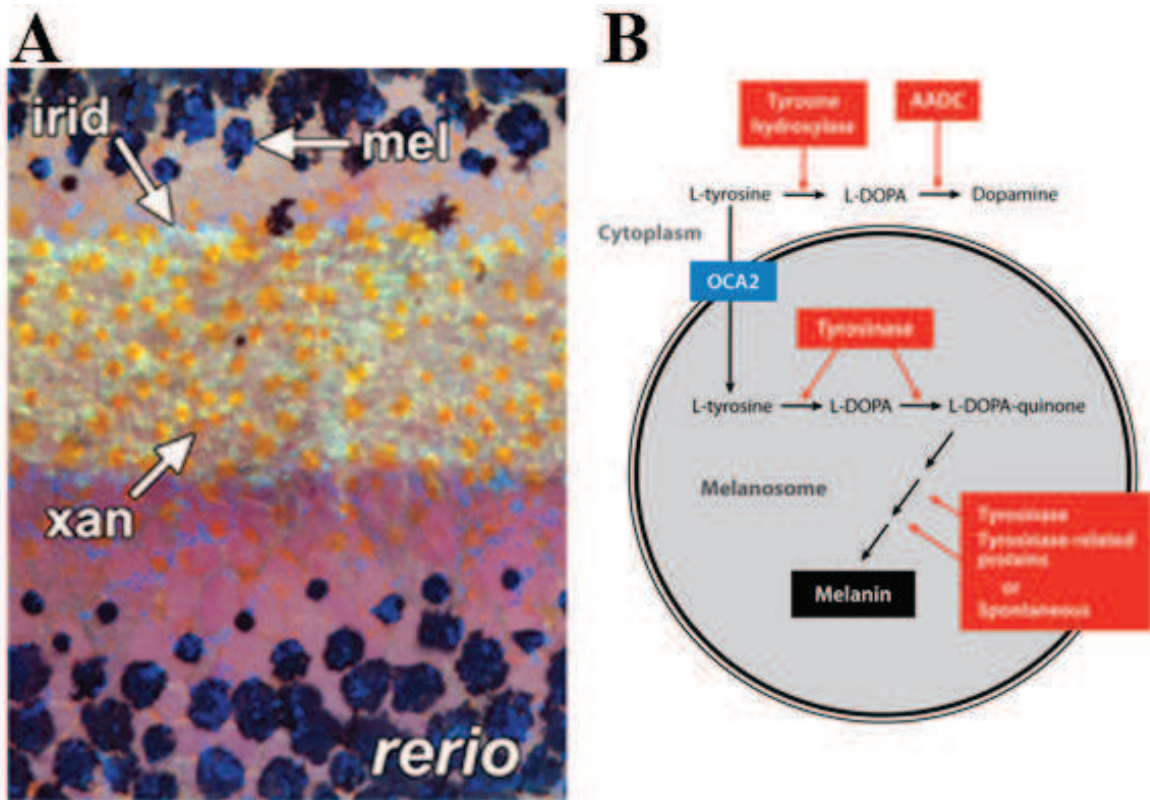
Lors du développement embryonnaire, un œil se forme quasi normalement chez les embryons d'*Astyanax* cavernicoles. Jusqu'à 24 heures post fécondation (hpf), l'œil du cavernicole présente une prolifération, un « patterning » et des processus de différenciation normaux (Alunni et al., 2007). La CMZ est active chez les SF et les CF et les neurones générés s'incorporent normalement dans les couches de la rétine (Jeffery, 2009; Strickler et al., 2002) (figure 8B et C). Cependant, l'œil du CF est plus petit. En particulier, le quadrant ventral de la rétine est réduit ou absent (Pottin et al., 2011) (figure 8D et E). Puis, la dégénérescence du cristallin par apoptose entraîne indirectement la dégénérescence de la rétine (Alunni et al., 2007; Yamamoto, 2000; Yamamoto et al., 2004). Lorsque l'œil dégénère et s'atrophie, il est encapsulé dans une boule de graisse et forme un « kyste » (figure 8H).

L'ensemble du système visuel est affecté par la dégénérescence des yeux. En particulier, le toit optique des CF est atrophié par rapport à celui des SF (Soares et al., 2004).

### 1.2.2 La perte de la pigmentation

Jeffery explique que la diminution voire la disparition de la pigmentation des CF est un autre caractère des plus marquant (cf. figure 4A)(Jeffery, 2009). La coloration des SF leur permet de se protéger de la lumière, de se camoufler et de reconnaître les individus de leur espèce et les partenaires sexuels éventuels (Protas and Patel, 2008). En absence de lumière et étant aveugles, les CF ne peuvent utiliser ce type de reconnaissance.

Les *Astyanax* possèdent trois types de cellules pigmentées : les mélanophores noirs, les iridophores argentés et les xanthophores orangés (cf. figure 9A). Les CF ont peu ou pas de mélanophores, ces derniers contenant peu voire pas de mélanine. Cela explique la couleur rosée de leurs corps. La majorité des poissons de Pachón et de Molino sont totalement albinos. Cependant, des mélanophores (dérivés des crêtes neurales) sont présents chez ces poissons, mais ces cellules sont décolorées en l'absence de mélanine. Chez les CF non albinos, il y a une réduction du nombre de mélanophores et une réduction de la quantité de



**Figure 9 : La pigmentation**

(A) Photographie des différentes cellules pigmentaires chez un poisson zèbre *Danio rerio* adulte. Les flèches blanches pointent les mélanophores (mel), les iridophores (irid) ou les xanthophores (xan). D'après (Parichy, 2006). (B) Résumé des différentes étapes de la formation de mélanine à partir de la L-tyrosine. La protéine *Oca2* joue probablement un rôle dans le transport de la L-tyrosine vers l'intérieur du mélanosome. D'après (Jeffery, 2009).

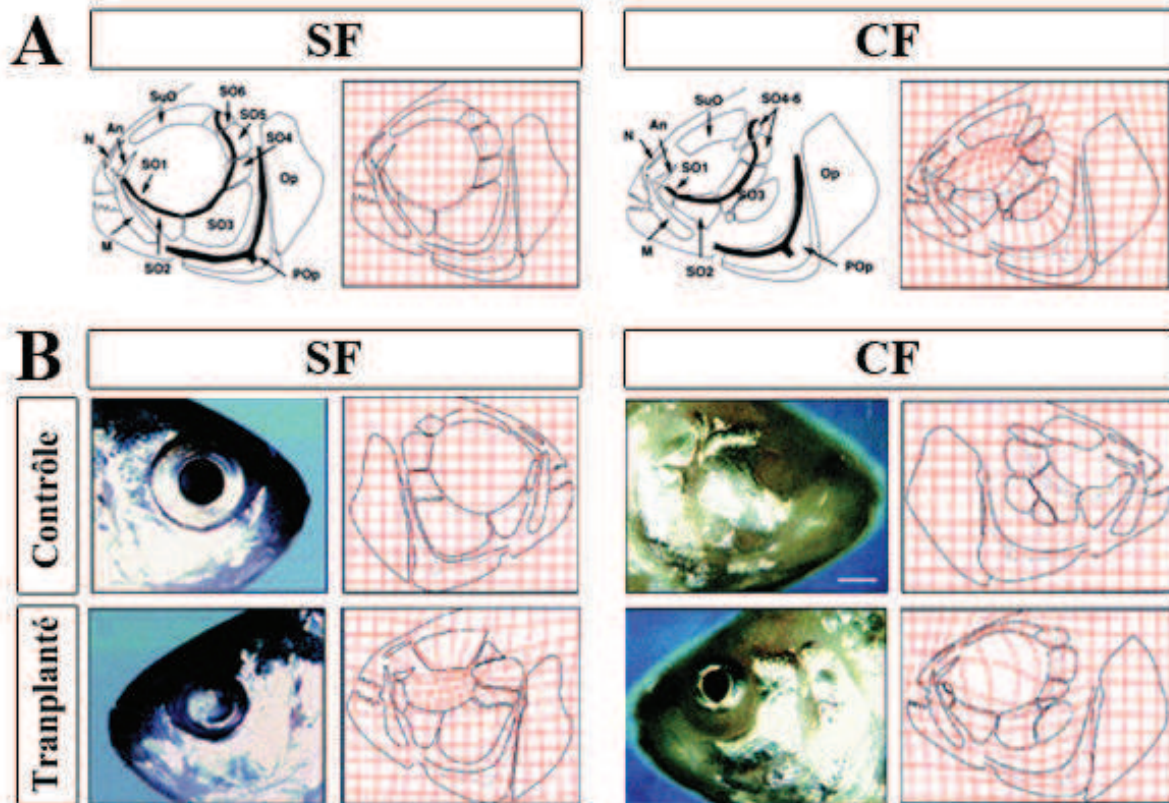
mélanine qu'ils contiennent. Dans ce cas, les cellules ne sont pas noires mais plutôt marron. Les différents phénotypes de colorations existant dans les différentes populations cavernicoles indiquent une origine multiple et indépendante pour la régression de la pigmentation.

Les différentes cellules pigmentaires dérivent des crêtes neurales. Les études de McCauley montrent que la formation des cellules pigmentaires à partir des crêtes neurales et leurs voies de migration ne sont pas modifiées chez les CF de Pachón (McCauley et al., 2004). En revanche, les croisements entre les SF et les CF ont permis d'identifier deux loci responsables de la perte et de la diminution de la pigmentation : *Oca2* (oculocutaneous albinism 2) (Protas et al., 2006) et *Mcr1* (melanocortin 1 receptor) (Gross et al., 2009). Ces deux gènes interviennent dans la synthèse de la mélanine.

En effet, comme le montre la figure 9B, *Oca2* est un transporteur de la L-tyrosine, précurseur de la mélanine, dans le mélanosome. L'analyse des séquences de *Oca2* des populations CF montre des mutations ou d'importantes délétions, induisant la perte de fonction de ce gène (Protas et al., 2006). Le phénotype albinos des différentes populations est induit par différentes mutations localisées au sein de ce gène. Sa perte de fonction bloque l'apport de L-tyrosine dans le mélanosome et la synthèse de mélanine s'arrête, faute de précurseur à transformer.

Le phénotype marron est dû à une modification du gène *Mcr1* (Melanocortin type 1 receptor) qui code un récepteur de MSH $\alpha$  (melanocyte stimulating hormone) (Rees, 2003). En effet, l'activation de *Mcr1* après la fixation de son ligand induit une cascade de transcription de gènes impliqués dans le contrôle de la pigmentation. En cas de mutation de ce gène, la synthèse de la mélanine n'est que peu activée, conduisant à la formation de mélanophores ayant peu de mélanine et ayant l'aspect marron.





**Figure 10 : Modifications cranio-faciales entre les populations et après les transplantations de cristallin.**

(A) Anatomie du crâne des SF (à gauche) et des CF (à droite). Les CF possèdent plus d'os et leurs positionnements sont modifiés (déformation de la grille de repérage rouge). Les canaux suborbitaux (en haut) et préoperculaires (en bas) sont marqués en noir.

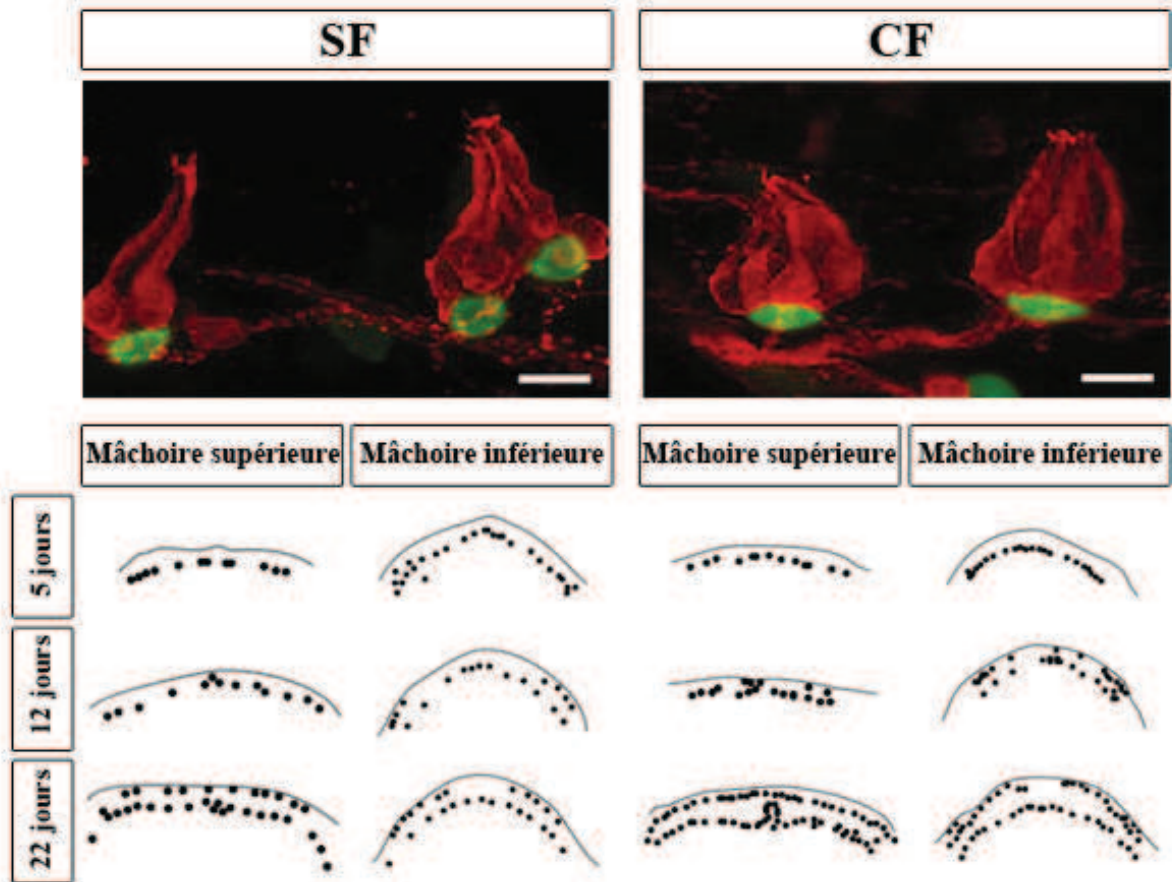
(B) La transplantation d'un cristallin cavernicole dans un embryon de surface provoque la dégénérescence de l'œil et la modification de l'anatomie des os du crâne, ceux-ci changeant de forme et convergeant vers l'orbite (rétrécissement de la grille). A l'inverse, la transplantation d'un cristallin de SF dans un œil CF permet la conservation d'un œil et provoque des modifications anatomiques, les os s'affinant et s'éloignant de l'orbite (dilatation de la grille de repérage). Abréviations ; nasal bone (N), antorbital bone (An), maxillary bone (M), supraorbital bone (SuO), suborbital bones 1 à 6 (SO1– 6), preopercular bone (Pop), opercular bone (Op). Figure modifiée à partir de (Yamamoto et al., 2003).

Comme le montrent les différents exemples précédents, les CF ont subi des « pertes » au niveau morphologique. Cependant, les exemples suivants vont présenter certaines modifications majeures et « constructives » de la morphologie des CF.

### **I.2.3 Modification du squelette cranio-facial.**

Il existe des différences au niveau de la structure du crâne des différentes populations d'*Astyanax*. L'œil des SF est entouré par un seul os supraorbital et six os suborbitaux de taille et de forme similaire (figure 10A). Chez les CF, il y a une modification du nombre, de la taille et du positionnement de ces os par rapport à l'orbite (Yamamoto et al., 2003). De plus, le nombre de dents présentes au niveau des os maxillaires est plus important chez les CF et leurs mâchoires sont plus larges.

Des études ont démontré que certaines de ces modifications sont induites par la dégénérescence de l'œil. En effet, dans le cas où une transplantation de cristallin SF est effectuée dans un œil cavernicole, celui-ci ne dégénère pas (Yamamoto et al., 2003). La présence de l'œil modifie la taille et la position des os suborbitaux, l'anatomie du crâne du CF se rapprochant du phénotype SF. À l'inverse, après la transplantation d'un cristallin cavernicole dans l'œil d'un embryon de SF, la taille et le positionnement des os se modifient pour « combler » l'orbite à l'âge adulte (figure 10B). Ces modifications sont d'autant plus importantes lorsque les transplantations sont réalisées à des stades précoces du développement (Dufton et al., 2012). Cependant, certains caractères, comme le nombre de dents ou la largeur des mâchoires, ne sont pas modifiés par la dégénérescence ou la restauration de l'œil. La modification du squelette facial du CF n'est donc que partiellement induite par l'absence d'yeux.



**Figure 11 : Les papilles gustatives des *Astyanax mexicanus***

(A) Morphologie des bourgeons gustatifs de SF (à gauche) et de CF (à droite). Ils sont constitués de plusieurs cellules sensorielles (marquage rouge, anticorps anti-calrétinine) et de neurones sérotoninergiques au niveau basal (marquage vert, anticorps anti-sérotonine). Barre d'échelle : 10 $\mu$ m. (B) Schéma représentant la distribution des bourgeons gustatifs sur les mâchoires inférieures et supérieures des SF (à gauche) et des CF (à droite) en fonction de l'âge. Figure modifiée d'après (Varatharasan et al., 2009)

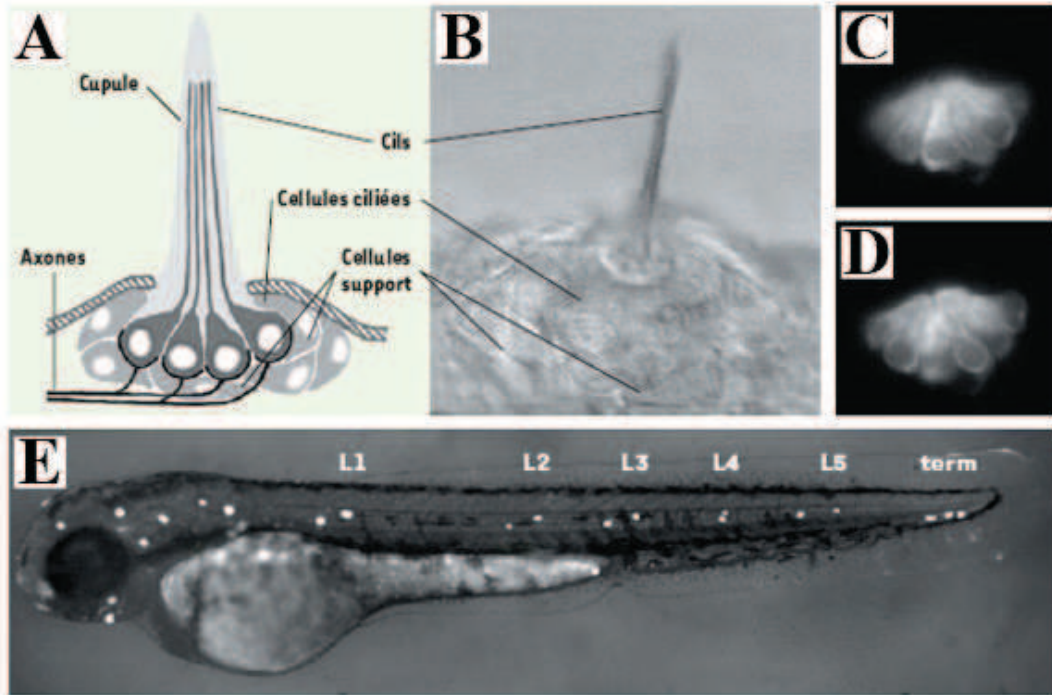
#### **I.2.4 Le système gustatif**

Au niveau de la bouche du poisson, les CF ont non seulement des mâchoires plus larges et plus saillantes que les SF, mais il y a aussi des différences au niveau du système gustatif. Les papilles gustatives sont les structures sensorielles permettant la perception du goût lors d'un contact avec des molécules présentes dans l'environnement. Elles sont présentes principalement sur les lèvres, dans la bouche et dans le pharynx. Bien que la structure d'une papille gustative soit identique chez toutes les populations (Jeffery, 2001; Varatharasan et al., 2009), elles sont bien plus nombreuses chez les CF (figure 11). Lors de croisement entre des SF et des CF, les études ont montré qu'il existait une corrélation inverse entre la taille de l'œil et le nombre de papilles gustatives, suggérant un échange sensoriel entre les systèmes visuels et gustatifs (Yamamoto et al., 2009)

#### **I.2.5 La ligne latérale et les neuromastes**

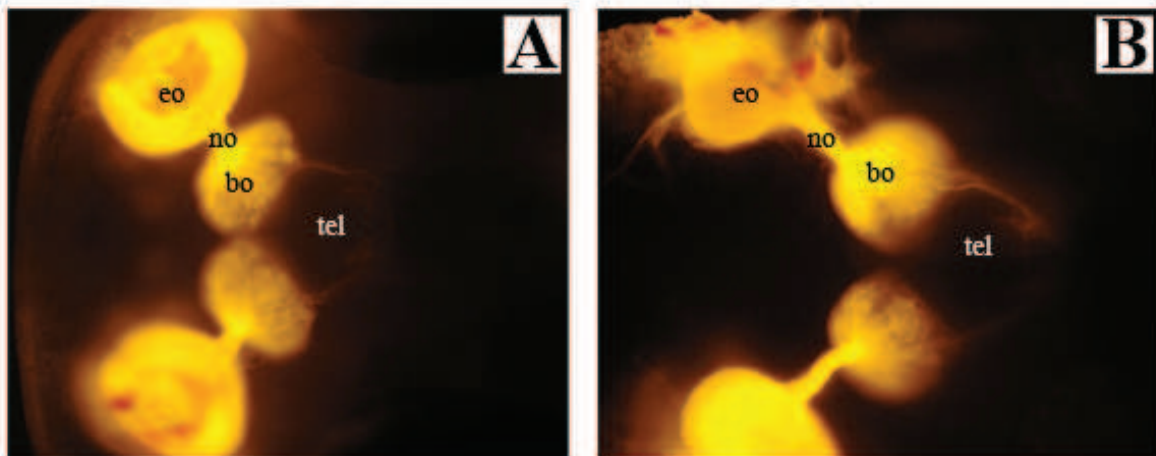
La ligne latérale est un système mécano-sensoriel présent chez les amphibiens et les poissons. Ce système est sensible aux mouvements d'eau dans le milieu environnant, ce qui permet notamment à l'animal d'éviter les obstacles, de détecter ses proies ou ses prédateurs et de nager en bancs sans visibilité : il s'agit véritablement d'une forme de « toucher à distance » (Ghysen and Dambly-Chaudière, 2003). Le système de la ligne latérale est composé d'un ensemble d'organes superficiels, les neuromastes, arrangés en lignes. Certains neuromastes sont aussi présents sur la peau de la tête.

Les neuromastes sont des structures sensorielles dont la fonction est de détecter la variation de la pression hydrostatique, comme par exemple aux abords d'une paroi ou à proximité d'un autre poisson. Ces structures fonctionnent sur le même principe que nos cellules auditives. Chaque neuromaste est composé de cellules ciliées entourées de cellules de



**Figure 12 : Les neuromastes et leurs répartitions chez le poisson zèbre**

(A) Schéma d'un neuromaste en vue latérale. (B) Photographie d'un neuromaste en vue latérale. (C et D) Vues latérales, dans deux plans focaux, d'un neuromaste marqué par le fluorochrome 2-Di- 4-Asp (qui s'accumule préférentiellement dans les cellules ciliées). (E) Vue latérale d'un embryon de poisson zèbre de 48 h. Les notations L1 à L5 indiquent les cinq neuromastes de la ligne latérale postérieure, la notation « term » correspond aux neuromastes terminaux. D'après (Ghysen and Dambly-Chaudière, 2003).



**Figure 13 : Système olfactif des *Astyanax mexicanus***

Marquages des voies olfactives primaires de SF (A) et de CF (B) par des cristaux de DiI appliqués sur l'épithélium olfactif. Cette molécule, liposoluble, s'insère dans les membranes et, dans le cas de neurone, marque les projections axonales.

Abréviations : épithélium olfactif (eo), nerf olfactif (no), bulbe olfactif (bo) et télencéphale (tel)

D'après SR et YE, données non publiées.

soutien, et est innervé par deux neurones bipolaires localisés dans un ganglion crânien (figure 12). Ces structures sont retrouvées sur la tête et tout le long du corps du poisson, formant la ligne latérale (figure 12E). Les neuromastes de la tête innervent les ganglions pré-otiques alors que les neuromastes du reste du corps innervent les régions post-otiques (Ghysen and Dambly-Chaudière, 2005).

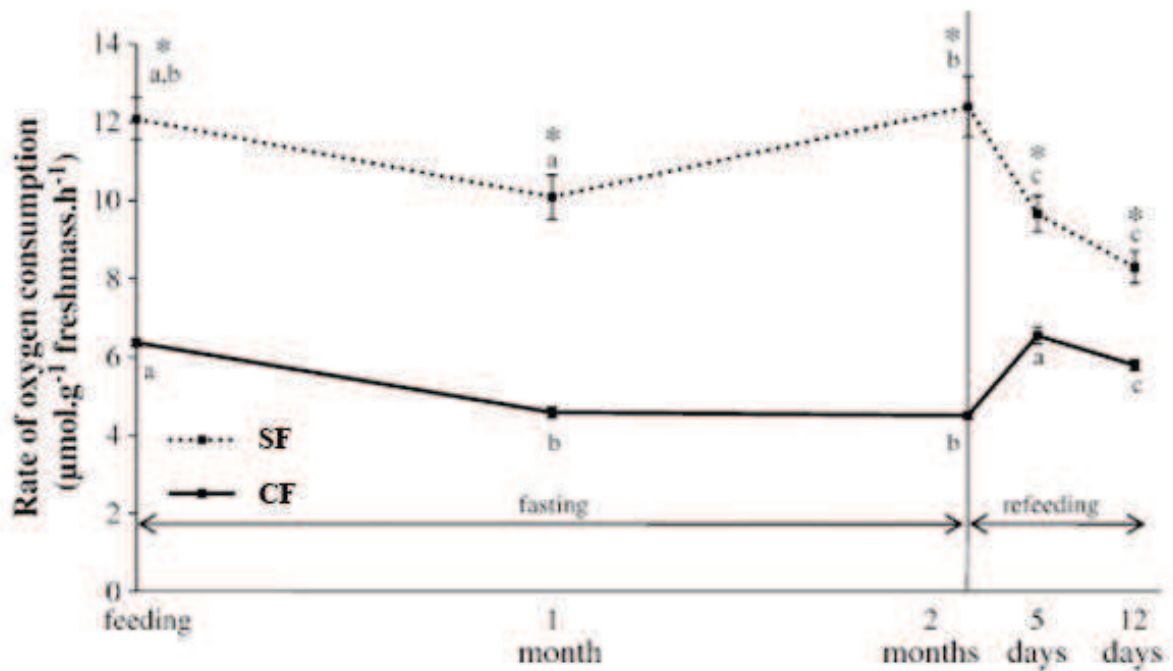
Les études ont montré que les CF avaient plus de neuromastes au niveau de la tête (Jeffery, 2001). D'après Montgomery, il y a des milliers de neuromastes supplémentaires sur l'ensemble du corps des CF (Montgomery et al., 2001). De plus, les cils sont deux fois plus longs chez les CF et leurs agencements sont modifiés dans les canaux de la ligne latérale. L'auteur suppose que ces modifications peuvent augmenter la sensibilité des neuromastes.

D'un point de vue développemental, les neuromastes se forment en même temps que les papilles gustatives et ces deux types cellulaires expriment le gène *Prox1* (Jeffery et al., 2000). Le nombre de cellules exprimant ce gène est deux fois plus important chez les CF.

### **I.2.6 Le système olfactif**

L'organisation du système olfactif est similaire entre les populations de SF et CF. En effet, comme le montre la figure 13, l'épithélium olfactif présent dans les narines des poissons est relié aux bulbes olfactifs, la partie la plus antérieure du cerveau, via les nerfs olfactifs. Des fibres secondaires conduisent ensuite l'information vers le télencéphale et le diencephale.

Cependant, la taille de certaines régions est modifiée. En effet, l'épithélium olfactif est plus étendu chez les CF (Jonathan Bibliowicz, données de l'équipe non publiées) et les bulbes olfactifs sont plus gros. La variation de la taille du nerf olfactif (plus long chez les CF) peut sans doute être expliquée par la modification de la forme du crâne et la nécessité de relier l'épithélium olfactif au bulbe. Cependant, les fibres secondaires dans le télencéphale semblent plus diffuses chez les CF.



**Figure 14 : Changement de la consommation d'oxygène en période de jeûne**

Variation de la consommation d'oxygène des SF (en pointillé) et des CF (en trait plein) pendant une longue période de jeûne puis après la reprise de nourrissage. Les astérisques correspondent à des différences significatives entre les populations et les points avec une même lettre (a-c) indiquent des valeurs statistiquement similaires au sein d'une même population (Salin et al., 2010).

### I.2.7 Modification du métabolisme

Si on compare la morphologie des SF et des CF, on observe que les CF sont plus « trapus ». Les cavernicoles sont beaucoup plus gras que les SF car ils ont la capacité de faire d'importantes réserves lipidiques.

Le métabolisme est différent entre les populations. On parle d'hypométabolisme chez les CF car, comme le montre les points des courbes à l'origine (figure 14), leur consommation d'oxygène est plus faible que ceux des SF dans des conditions équivalentes.

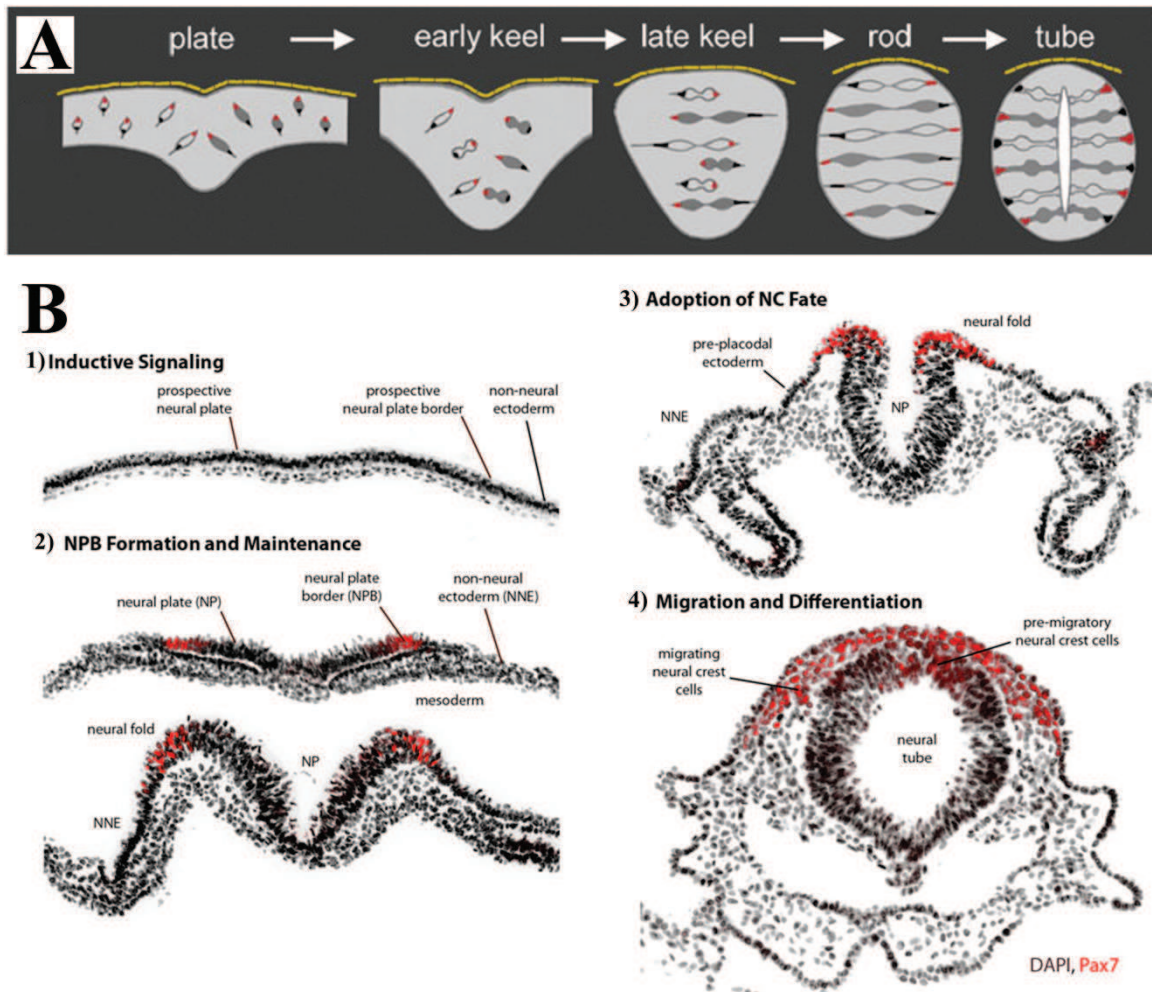
Pendant une période de jeûne, les CF ne s'adaptent que peu et leur activité métabolique ne varie quasiment pas. Il est probable que, ayant déjà un métabolisme ralenti, ils ne puissent pas le diminuer davantage en l'absence de nourriture. Au contraire, en période de jeûne, les SF diminuent leurs activités locomotrices et leur métabolisme. Malgré ce changement, les SF ont toujours un métabolisme plus important que les CF (figure 14). Après la période de jeûne, le métabolisme des SF diminue fortement malgré l'apport de nourriture, probablement pour renouveler les réserves énergétiques consommées pendant cette période (Salin et al., 2010).

Les CF consomment plus de glycogène, de triglycéride et de protéine que les SF (Salin et al., 2010). Malgré cela, ceux-ci résisteront mieux à une période de jeûne que les SF (Natalya Gallo, Communication personnelle, *Astyanax* international meeting, 2011).

Les CF n'ont pas seulement subi des modifications morphologiques et physiologiques. Leur comportement a également varié au cours de l'évolution. Cela sera discuté plus loin au cours de la partie « II.4 Le modèle *Astyanax mexicanus* et la biologie du comportement ».

Pour mieux comprendre comment ces traits morphologiques ont changé au cours de l'évolution, il est nécessaire d'avoir une approche de type Evo-Dévo. En effet, les différences présentées précédemment sont pour la plupart issues de modifications fines du développement des premiers stades embryonnaires.





**Figure 15 : La formation du tube neural**

(A) Schéma explicatif de l'organisation et du comportement cellulaire lors des stades plaque neurale (NP, neural plate), quille neurale (early keel), tige neurale (rod) et tube neural (tube) (Clarke, 2009). (B) Les crêtes neurales (NC) se forment et sont expulsées lors de la fermeture du tube neural. *Pax7* (en rouge) est exprimé dans les cellules de la frontière de la plaque neurale (NPB) et par les crêtes neurales. Son expression permet d'observer la migration des crêtes neurales (Stuhlmiller and García-Castro, 2012).

## **I.3 Notions de développement chez les vertébrés et les poissons téléostéens**

Le développement d'un organisme est un sujet vaste et complexe. Les données ci-dessous présentent la mise en place du système nerveux des vertébrés. Les spécificités développementales des poissons téléostéens seront également précisées.

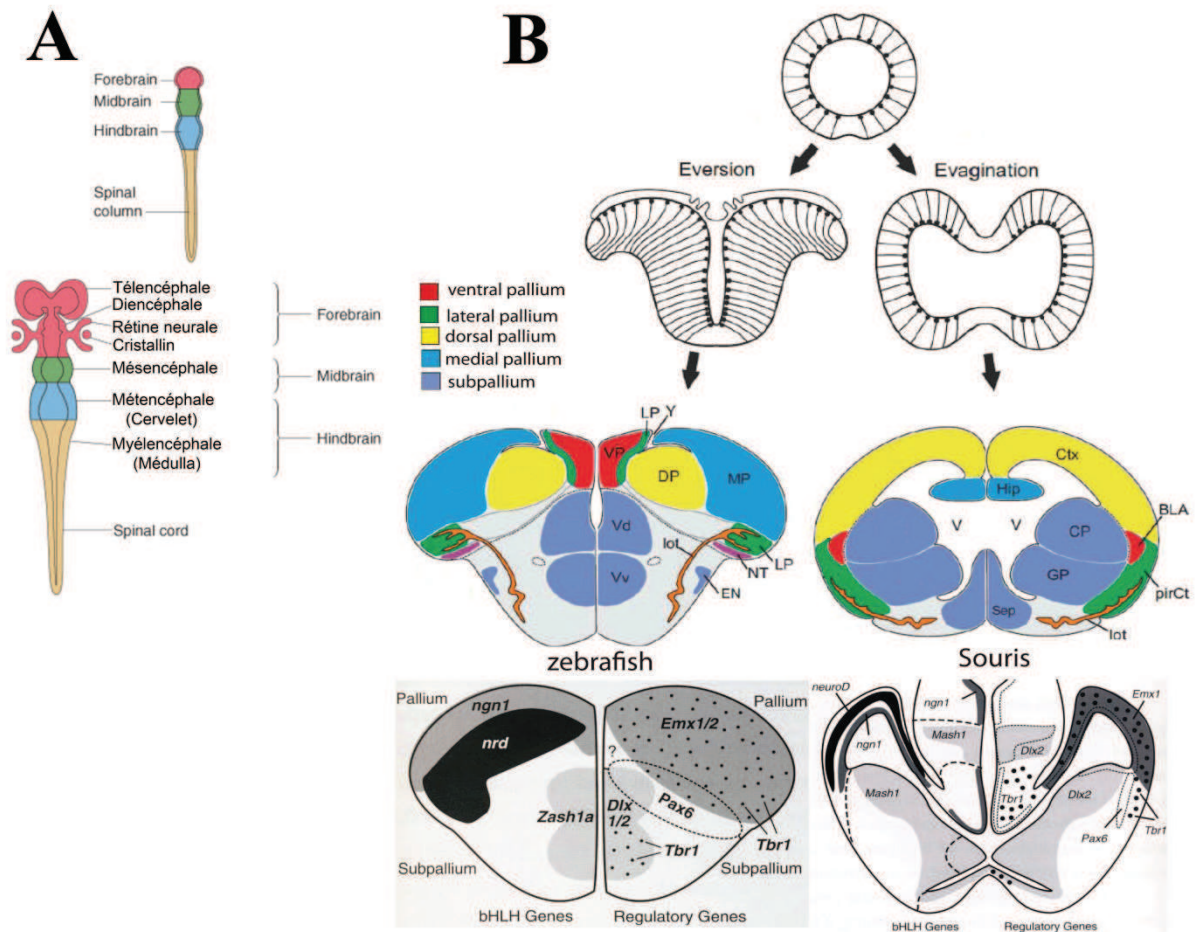
### **I.3.1 Le développement précoce du système nerveux**

Le système nerveux central des vertébrés est formé à partir d'une structure appelée la plaque neurale qui apparaît dans un épaissement de l'ectoderme à la fin de la gastrulation.

La plaque neurale se développe ensuite par des mouvements cellulaires pour former un sillon puis la gouttière neurale. Les parois de la gouttière vont converger l'une vers l'autre et fusionner pour former un tube clos : le tube neural (cf. figure 15). Chez les téléostéens, le tube neural ne se forme pas tout à fait selon le même cheminement. Comme le montre la figure 15A, la plaque neurale s'invagine au niveau de la ligne médiane, s'affaisse et forme une structure de l'apparence d'une quille (keel formation) puis se referme afin de former une tige neurale (neural rod) puis le tube neural (Clarke, 2009).

Lors de sa fermeture, une partie du tissu est expulsée vers l'extérieur et formera les crêtes neurales, structures qui se développeront par la suite pour former entre autres le système nerveux périphérique, et la majorité des os du crâne et de la face et les cellules pigmentaires.

La partie postérieure du tube neural donne la moelle épinière et la partie la plus antérieure forme trois vésicules : le prosencéphale (cerveau antérieur), le mésencéphale (cerveau moyen) et le rhombencéphale (cerveau postérieur) (Figure 16A). Elles se divisent ensuite en cinq vésicules. Le prosencéphale se subdivise en télencéphale et en diencéphale, le mésencéphale reste sous forme d'une vésicule unique tandis que le rhombencéphale se divise



**Figure 16 : Développement du système nerveux central à partir d'un tube**

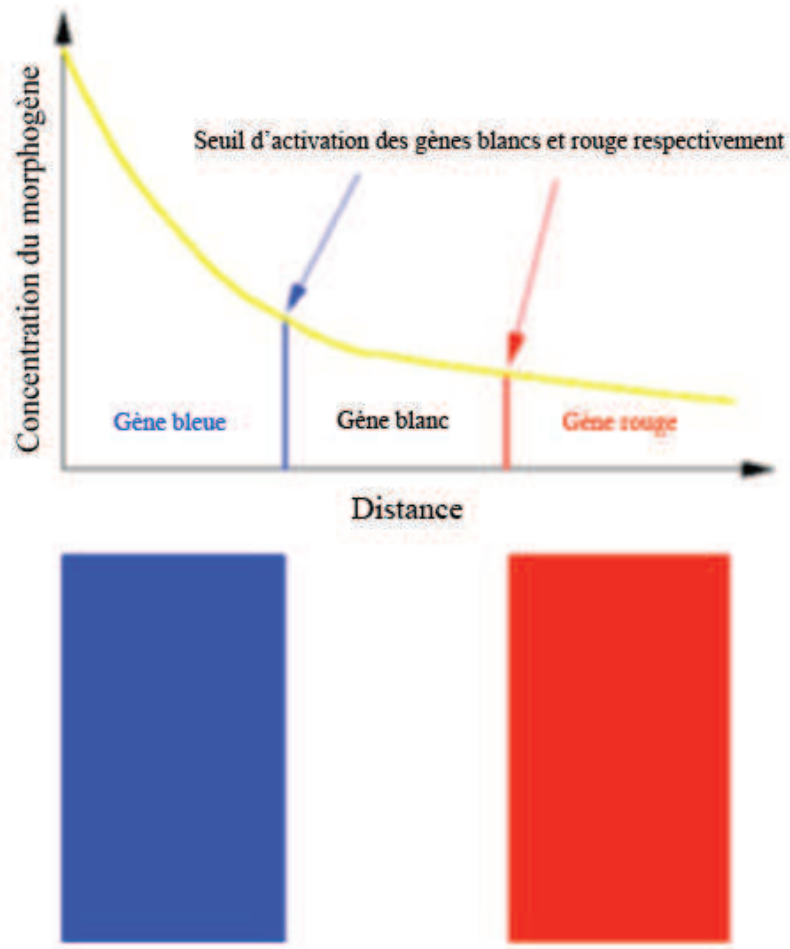
(A) Les trois premières divisions du cerveau apparaissent sous forme d'un bourgeonnement de trois vésicules du tube nerveux : le cerveau antérieur (forebrain), cerveau moyen (midbrain) et cerveau postérieur (hindbrain). Certaines de ces vésicules vont se subdiviser. Le cerveau antérieur donne naissance aux vésicules télencéphaliques paires et au diencéphale tandis que le cerveau postérieur donne naissance au métencéphale et au myélocéphale (Sanes et al., 2006).

(B) Vue coronale du tube neural antérieur qui va donner le télencéphale. Le télencéphale se développe par éversion chez les téléostéens alors qu'il se développe par évagination chez les mammifères. Les régions d'une même couleur sont considérées comme homologues (Mueller and Wullmann, 2005).

en métencéphale et myélocéphale qui donneront respectivement le cervelet et la médulla (Sanes et al., 2006).

La formation de ces vésicules est globalement semblable chez l'ensemble des vertébrés. Cependant, par la suite, le développement du télencéphale des poissons téléostéens est particulier. En effet, comme le montre la figure 16B, là où chez les autres vertébrés les hémisphères télencéphaliques se développent selon un processus d'évagination, le télencéphale des téléostéens subit un développement par éversion (qui signifie "croissance vers l'extérieur") : le télencéphale bourgeonne latéralement et se divise en deux hémisphères s'éloignant l'un de l'autre (Striedter and Northcutt, 2006). Néanmoins, à l'aide de l'étude des patrons d'expression des gènes au cours du développement, on peut cartographier et identifier des sous-régions homologues entre les téléostéens et les mammifères dont le cerveau est beaucoup plus étudié (figure 16B). Wulliman et son équipe ont combiné chez le poisson zèbre *Danio rerio* les études des patrons d'expression, de la prolifération et de la migration cellulaire pour définir précisément une carte du télencéphale (Mueller et al., 2011). Des différences apparaissent entre les mammifères et les téléostéens suite aux mouvements morphogénétiques, comme la modification de la polarité des hémisphères : ainsi, la partie dorsomédiane du télencéphale précoce reste à la même place durant l'évagination des mammifères (c'est le futur hippocampe) alors qu'elle se place chez les téléostéens en partie dorso-latérale après une éversion.

D'autres auteurs (Yamamoto et al., 2007) ont proposé des mouvements morphogénétiques encore plus complexes, ajoutant au mouvement d'éversion médio-latéral un mouvement « postéro-latéral ».



**Figure 17 : Système du drapeau français**

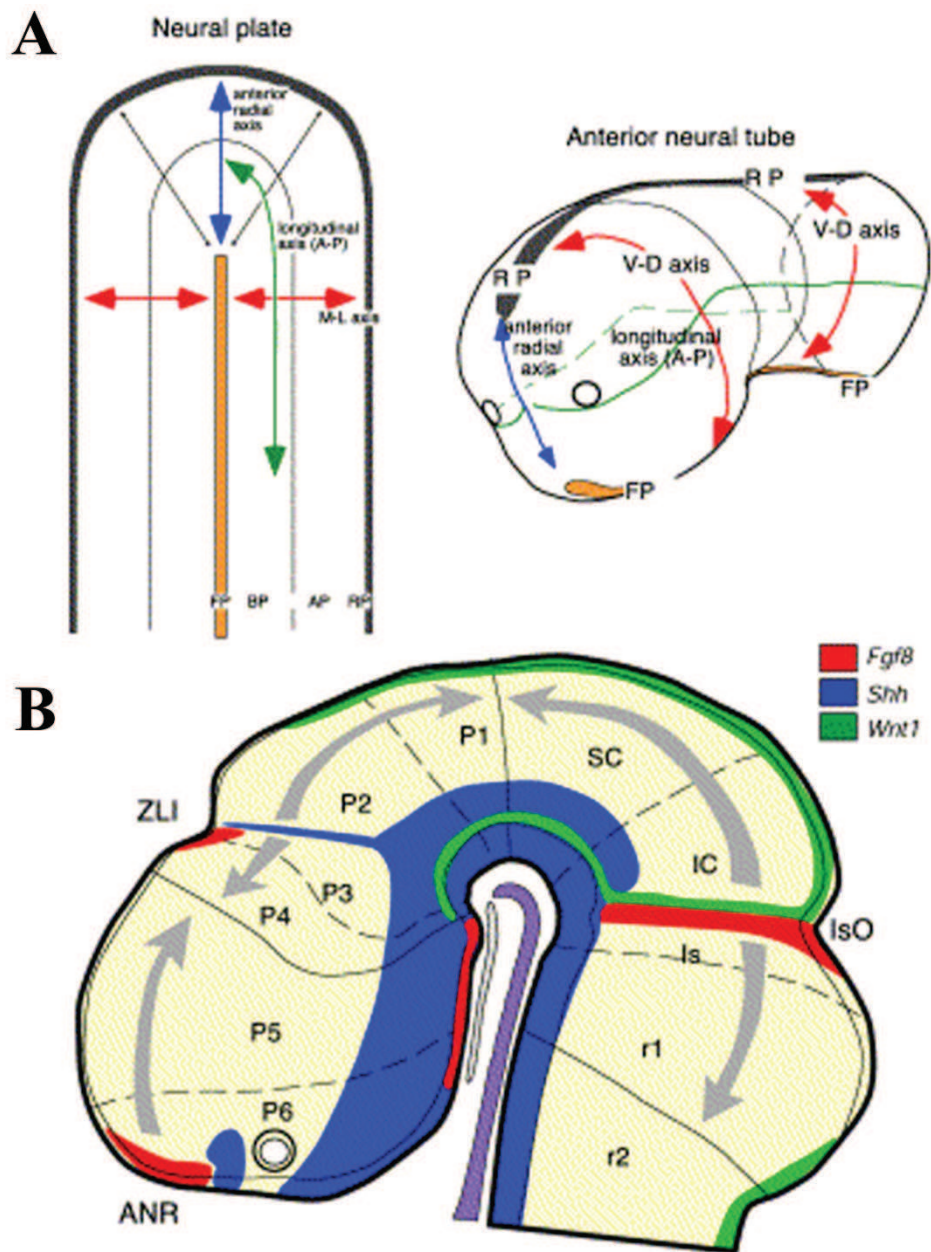
La diminution de la concentration d'une molécule morphogène en fonction de la distance permet d'expliquer théoriquement la formation de phénotype de type « drapeau français ». Au fur et à mesure que la concentration diminue, différents gènes seront activés. Le principe clé est que les gènes n'ont pas les mêmes seuils d'activation.

### I.3.2 La régionalisation du système nerveux est sous l'influence de voies de signalisation

La régionalisation du tube neural est une phase primordiale du développement. Les axes antéro-postérieur (AP) et dorso-ventral (DV) sont très importants pour que le système nerveux se forme correctement. Ils sont déjà en place au stade plaque neurale. En effet, des centres organisateurs dits « secondaires » se forment à des positions précises en fonction de ces axes. On appelle centre organisateur certains groupes de cellules qui vont sécréter des molécules. Ces signaux permettront aux cellules avoisinantes d'obtenir une identité et donc de se différencier.

Scholpp définit les organisateurs comme « *un groupe spécifique de cellules qui influence le développement direct des tissus avoisinants par la sécrétion de molécules de signalisation.* » L'organisateur est défini par six critères ; (1) La molécule de signalisation active est produite par une petite population de cellules bien définie. (2) L'ablation de cette population de cellules conduit à un défaut de développement des structures alentours. (3) La population de cellules greffées à une position ectopique compétente provoque l'induction de structures ectopiques. (4) Les organisateurs permettent de changer une structure spatialement simple en un champ diversifié et complexe. (5) La production ectopique des signaux principaux est capable de mimer les fonctions majeures de l'organisateur. (6) L'efficacité des organisateurs dépend du moment de leurs apparitions, du mode de propagation de la molécule signal et de comment leurs signaux sont convertis en réponses spécifiques par les tissus cibles. (Scholpp and Lumsden, 2010).

En fonction de la position d'une cellule au sein du tube neural, son identité cellulaire variera car elle ne sera pas soumise aux mêmes concentrations des molécules « morphogènes ». Un facteur morphogène affecte l'expression des gènes au sein d'une cellule cible de manière dose-dépendante, la concentration de la molécule diminuant avec la distance séparant la cible de la source. Pour expliquer le fonctionnement des molécules morphogènes,



**Figure 18 : Les centres de signalisation et la régionalisation du tube neural**

(A) Les axes du tube neural. Au niveau de la plaque neurale (à gauche), les flèches indiquent l'axe médio-latéral (M-L, en rouge), l'axe antéro-postérieur (A-P, en vert) et l'axe radial antérieur (anterior radial axis, en bleu). Après la formation du tube neural (à droite), la division suivant l'axe dorso-ventral (V-D axis) permet de distinguer la plaque du plancher (FP ou floor plate, en orange) la plaque du toit (RP ou roof plate, en gris) et les plaques alaire et basale (respectivement AP et BP pour alar plate et basal plate, en vert). (B) Représentation schématique de la position des différents centres organisateurs exprimant les de morphogènes (code couleurs), et de leurs zones d'influence (flèches) (Echevarria et al., 2003).

Abréviations : anterior neural ridge (ANR), prosomère 1 à 6 (P1-P6), *Zona limitans intrathalamica* (ZLI), organisateur isthmique (IsO), *superior colliculus* (SC), *inferior colliculus* (IC), isthme (Is), rhombomères 1 et 2 (r1-r2).

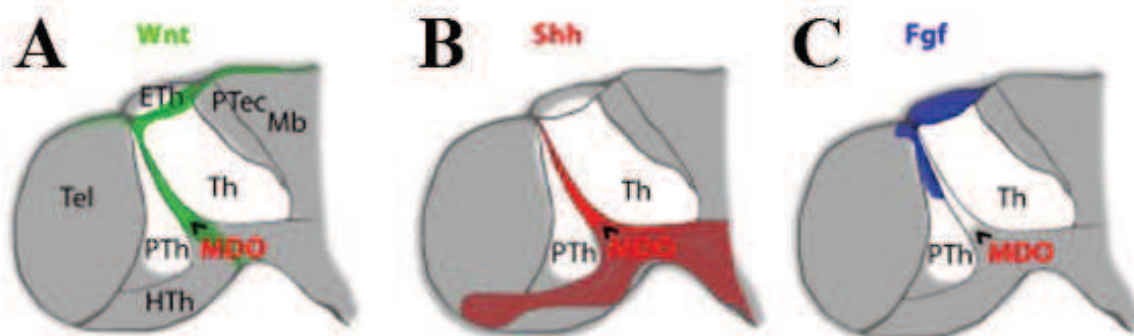
on peut se référer aux travaux fondateurs de Lewis Wolpert qui a proposé la « théorie du drapeau français » (Wolpert, 1969). Comme le montre la figure 17, il propose que la cellule modifie l'expression de ses gènes en fonction de la concentration de la molécule morphogène à laquelle elle est exposée. Ainsi, grâce à la diminution de la concentration en fonction de la distance de diffusion, on arrive à obtenir le pattern « drapeau français » en exprimant successivement les gènes bleu, blanc puis rouge. Grâce aux gradients de concentration des molécules morphogènes sécrétées par les différents centres organisateurs, les cellules sont capables de « connaître » leurs positions relatives au sein du tube neural.

Les centres de signalisation se mettent en place à des stades précoces du développement. Les gradients de concentration de ces facteurs et leurs combinaisons génèrent un champ d'organisation dans le neuroépithélium (figure 18B). Les sécrétions évoluant au fur et à mesure du développement, le champ d'organisation est un repère spatio-temporel pour les cellules. Il permet donc le bon développement des structures cérébrales car il gouverne l'expression de gènes responsables de la prolifération cellulaire, de la neurogénèse et de la régionalisation du cerveau (Vieira et al., 2010).

D'une part, il existe deux centres permettant la mise en place de l'axe DV : la ligne médiane dorsale et la ligne médiane ventrale. Quatre domaines sont formés suivant cet axe. Il s'agit, de la partie la plus ventrale à la plus dorsale, de la plaque du plancher (floor plate), la plaque basale (basal plate), la plaque alaire (alar plate) et la plaque du toit (roof plate).

D'autre part, la mise en place de l'axe AP est possible grâce à la formation de trois centres de signalisation dans la partie antérieure du tube neural, partie qui donnera le futur encéphale. Ces centres sont : le bourrelet neural antérieur ou *anterior neural ridge* (ANR), situé à l'extrémité rostrale du tube neural, la *zona limitans intrathalamica* (ZLI), située au milieu du diencephale entre les primordia du thalamus et du thalamus ventral, et l'organisateur isthmique (IsO ou MHB pour *midbrain-hindbrain boundary*) situé entre le mésencéphale et le rhombencéphale (figure 18B).





**Figure 19 : L'organisateur mi-diencephalique et le développement du thalamus**

L'organisateur mi-diencephalique (MDO) est la source de trois morphogènes dans la ZLI du cerveau embryonnaire. L'expression des molécules de signalisation *Wnt* (A) (en vert) chevauche le territoire d'expression de *Shh* (B) (en rouge). L'expression des membres de la famille *Fgf* (C) (en bleu) est située dans le préthalamus et elle chevauche partiellement celle de *Wnt* dans la plaque du toit (Hagemann and Scholpp, 2012).

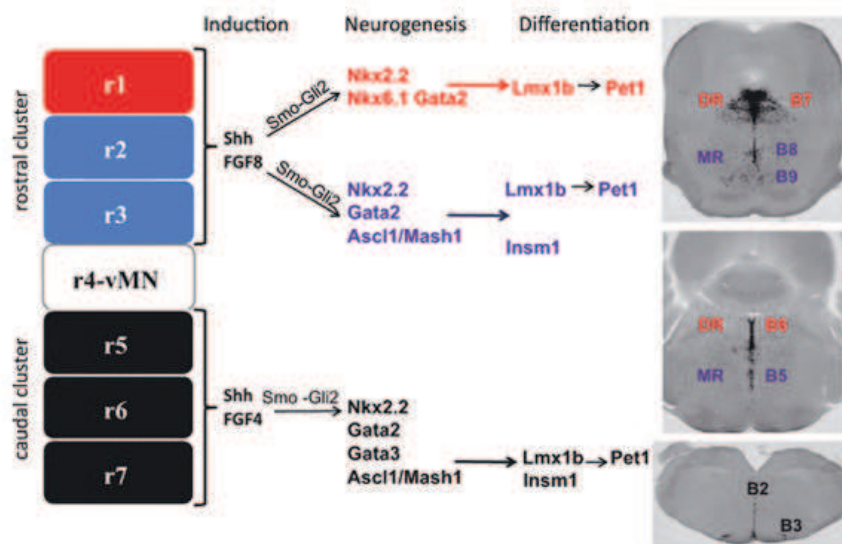
Abréviations : thalamus (Th), préthalamus (PTh), hypothalamus (HTh), épithalamus (ETh), télencéphale (tel), préteectum (PTec), mésencéphale (Mb pour midbrain), organisateur mi-diencephalique (MDO).

Comme le montre la figure 19, le centre organisateur MDO (mid-diencephalic organizer) de la ZLI est une source de trois grandes familles de morphogènes : Wnt (wingless integration site), Fgf (fibroblast growth factor) et Hh (Hedgehog). La zone d'expression de Wnt chevauche partiellement celle de Shh (Sonic hedgehog) au niveau de la MDO et l'expression de Fgf partiellement chevauche celle de Wnt. Prises ensemble, ces trois familles de molécules orchestrent et instruisent le développement du thalamus et de l'hypothalamus (Hagemann and Scholpp, 2012).

Du point de vue de l'axe dorso-ventral, la plaque du toit sécrète des signaux dorsalisants tels que les Wnt et Bmp (Bone morphogenetic protein), alors que la plaque du plancher, ainsi que la notochorde située sous le tube neural, sécrètent des facteurs ventralisants tels que Sonic hedgehog (Shh) ou Nodal.

La voie de signalisation Hh induit différentes classes de neurones dans le cerveau ventral. Par exemple, chez la souris, les facteurs Shh et Fgf8 jouent un rôle majeur dans la différenciation des neurones sérotoninergiques (Alenina et al., 2006; Deneris, 2011; Kiyasova and Gaspar, 2011). Comme le montre la figure 20, ces facteurs induisent dans le raphé des cascades de signalisation conduisant à l'expression des facteurs de transcription *Lmx1b* et *Pet1* qui permettent la spécification des neurones sérotoninergiques (Kiyasova and Gaspar, 2011). Chez le zebrafish, des neurones sérotoninergiques sont présents dans le cerveau antérieur, au niveau de l'hypothalamus (Lillesaar et al., 2009) et ils n'expriment pas le facteur *Pet1* (Gaspar and Lillesaar, 2012).

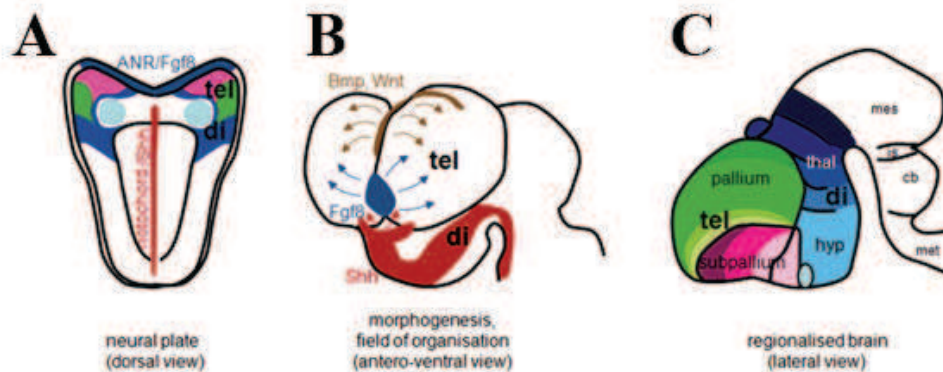
Les facteurs Fgf (fibroblast growth factor) et Shh induisent aussi le destin cellulaire des neurones dopaminergiques au niveau du cerveau antérieur (Hynes et al., 1995; Ye et al., 1998). Plus généralement, Shh contrôle la mise en place des structures ventrales du système nerveux comme les ganglions de la base (Sousa and Fishell, 2010) et de l'hypothalamus (Mathieu et al., 2002).



**Figure 20 : Signalisation induisant la formation des neurones sérotoninergiques dans le raphé.**

Représentation des mécanismes moléculaires contrôlant la neurogénèse et la différenciation des neurones sérotoninergiques dans les rhombomères, qui donneront le futur raphé. Les voies de signalisation et les facteurs de transcription impliqués dans la formation des différents noyaux (B2/B3, B5/B8/B9 et B6/B7) sont indiqués, et mettent en lumière un code (représenté en rouge, violet ou noir) dépendant de la position du rhombomère d'origine et de la combinaison des morphogènes et des facteurs de transcription exprimés. Les hybridations *in situ* de l'enzyme tryptophane hydroxylase *Tph2* (à droite) sont présentées en coupes coronales. Cette enzyme est un marqueur des neurones sérotoninergiques. (Kiyasova and Gaspar, 2011).

Abréviations : rhombomères 1 à 7 (r1-7), neurones moteurs ventraux (vMN), raphé dorsal (DR), raphé médian (MR).



**Figure 21 Chronologie du développement du cerveau antérieur des vertébrés.**

(A) Carte de devenir préemptif (« fate map ») de la plaque neurale antérieure. Les territoires présumptifs du télencéphale (tel, en rose et vert) et du diencéphale (di, en bleu) sont indiqués. Les centres de signalisation *anterior neural ridge* (ANR) et la notochorde (en rouge) sont indiqués. (B) Après la fermeture du tube neural, le prosencéphale se développe sous l'influence de molécules de signalisation sécrétées à partir de la face ventrale (*Shh*, en rouge), la ligne médiane dorsale (*Wnts* et *Bmp*, en marron) et le pôle rostral (*Fgf*, en bleu). Ensemble, ils génèrent un champ d'organisation et contrôlent la croissance et la morphogénèse. (C) Le cerveau antérieur est régionalisé. Le télencéphale (tel) est subdivisé en région sous-pallium (rose) et pallium (vert). Le diencéphale (di) est subdivisé en plusieurs domaines, comprenant le thalamus (thal) et l'hypothalamus (hyp) (Rétaux and Kano, 2010). Abréviations : mésencéphale (mes), isthme (is), cervelet (cb), métencéphale (met).

Comme le montre la figure 21, le destin cellulaire est déjà défini au stade plaque neurale. Sous l'action des différents facteurs morphogènes sécrétés par les centres organisateurs, les cellules prolifèrent et se différencient pour former les structures cérébrales fonctionnelles. En cas de modification du territoire d'expression d'un facteur morphogène, des conséquences sont visibles au niveau de la taille des structures associées.

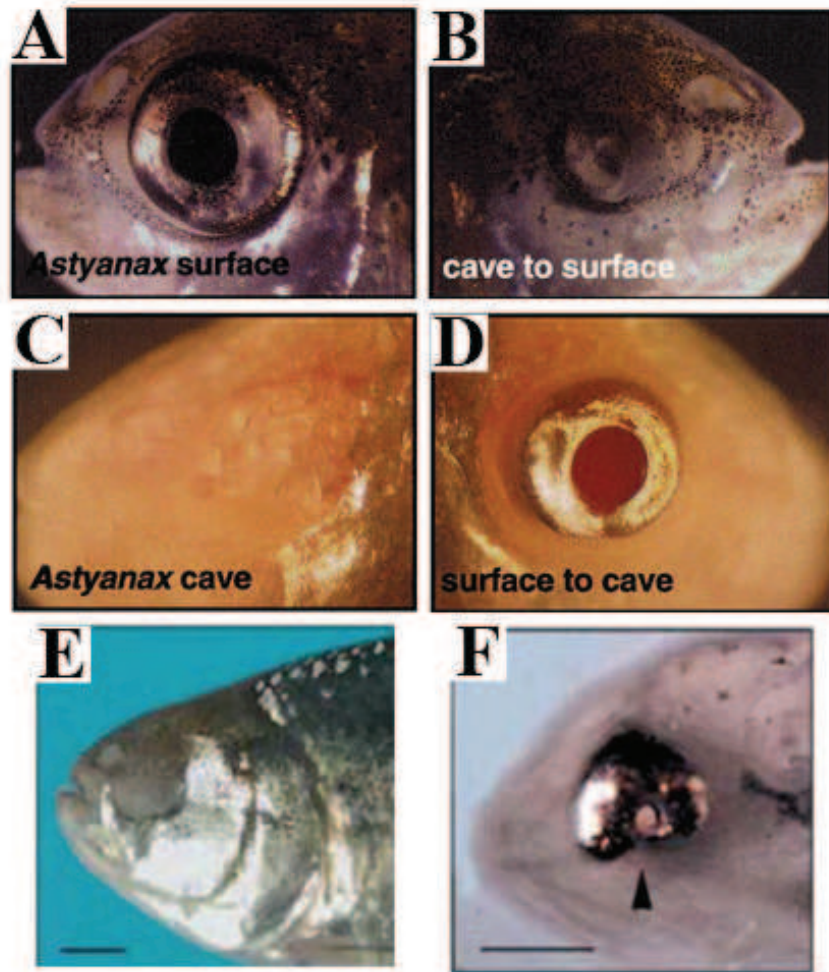
### **I.3.3 Modulations développementales chez les *Astyanax* cavernicoles.**

De subtiles variations ont été décrites entre le développement précoce des *Astyanax* de surfaces et cavernicoles. Certaines peuvent rendre compte des changements morphologiques observés chez les larves et les adultes. L'*Astyanax* est donc un modèle de choix pour « l'évo-dévo ».

#### ***I.3.3.1 La perte des yeux***

Comme décrit précédemment, durant les premiers stades de l'embryogenèse, les CF possèdent tout d'abord des yeux qui sont d'apparence normale (Alunni et al., 2007), même s'ils sont légèrement plus petits que ceux des SF et qu'ils ne possèdent pas le quadrant ventral de la rétine (Pottin et al., 2011). De plus, il a été démontré que le cristallin entre en apoptose à partir de 24 heures après la fécondation, entraînant la dégénérescence puis la disparition des yeux (Yamamoto, 2000).

Pour démontrer que l'apoptose massive du cristallin était bien la cause de la disparition de l'œil, Yamamoto et Jeffery ont réalisé des transplantations de cristallin entre les populations d'*Astyanax*. Ils ont cherché à savoir si l'apoptose du cristallin était une cause ou une conséquence de la dégénérescence des yeux en transplantant un cristallin SF sur un individu CF avant l'entrée en apoptose du cristallin natif. Ils ont ensuite observé le devenir de l'œil. Si l'apoptose est une conséquence de la dégénérescence, alors le cristallin de SF entrera



**Figure 22 : La perte des yeux chez les cavernicoles**

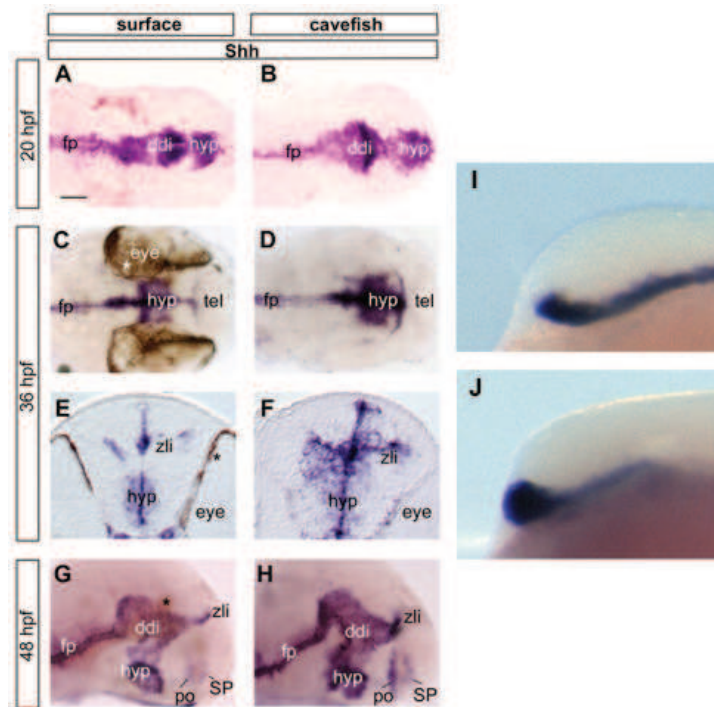
La transplantation d'un cristallin de CF dans un œil de SF induit la dégénérescence de celui-ci (B). L'œil SF transplanté avec un cristallin SF ne dégénère pas (A). A l'inverse, alors que l'œil contrôle du CF disparaît (C), celui-ci est maintenu dans le cas où une transplantation de cristallin de SF est effectuée (D) (Yamamoto and Jeffery, 2002). Après une injection d'ARNm de *Hedgehog* chez le SF, l'œil de l'alevin dégénère (E et F). La flèche noire en F indique la disparition du quadrant ventral de la rétine (comme chez le CF). La barre d'échelle correspond à 5mm (E) ou 100 $\mu$ m (F) (Yamamoto et al., 2004).

en apoptose dans un environnement CF. Au contraire, si l'apoptose est une cause de la dégénérescence de l'œil, alors le cristallin SF ne dégènera pas et il permettra à l'œil CF de se maintenir. Comme le montre la figure 22, l'expérience montre que l'apoptose du cristallin est une propriété autonome au cristallin cavernicole. Après cette transplantation, le poisson cavernicole présente un œil (Yamamoto and Jeffery, 2002). Dans certains cas, celui-ci semble même fonctionnel et le poisson n'est plus aveugle (Christophe Guibal, communication personnelle) mais généralement les CF transplantés ne répondent pas à des stimuli lumineux (Romero et al., 2003). A l'inverse, la transplantation d'un cristallin de CF dans un œil de SF conduit à la dégénérescence de ce dernier et à un phénotype « sans œil » à l'âge adulte (figure 22B).

Par ailleurs, la même équipe a aussi démontré que l'apoptose du cristallin était indirectement lié à l'expansion du territoire d'expression chez le CF de deux facteurs morphogènes : Sonic hedgehog (*Shh*) et *tiggy-winkle* hedgehog (*twhh*) (Yamamoto et al., 2004). En effet, comme le montre la figure 22E et 22F, on observe une disparition du quadrant ventral de l'œil, comme chez le CF (Pottin et al., 2011), puis une dégénérescence complète de l'œil de SF après une injection de l'ARNm de *Shh* et *Twhh*. Ces expansions d'expression des facteurs Hedgehog ont lieu de manière précoce et ont d'autres conséquences sur le développement du cerveau des CF, entre autre sur la régionalisation du cerveau et la prolifération du télencéphale et du diencephale.

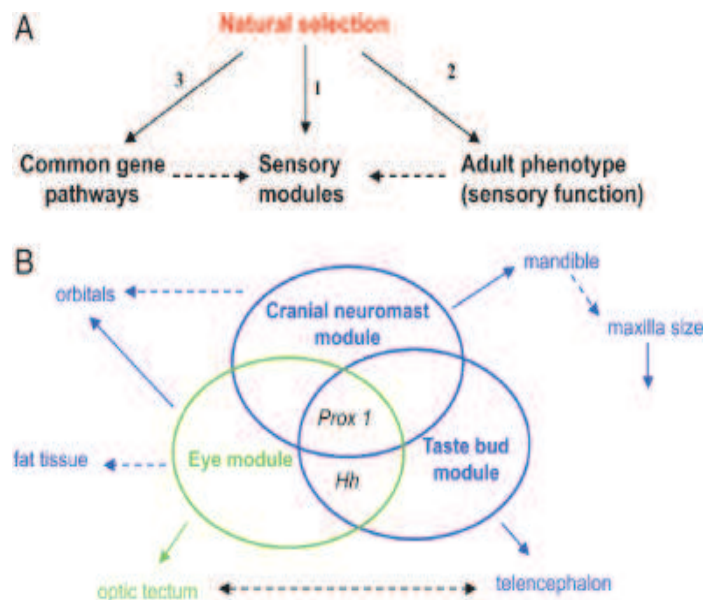
### ***1.3.3.2 Modifications de la régulation des voies de signalisation et leurs conséquences***

Comme présenté dans les parties I.2.3 et I.2.4, les CF possèdent des mâchoires élargies et plus de bourgeons gustatifs que les SF. L'extension du territoire d'expression de *Shh* est située au niveau de la région oraux-pharyngiale (qui contiendra plus tard les mâchoires et les bourgeons gustatifs). Yamamoto a montré que la signalisation *Shh* contrôle le développement des mâchoires et des bourgeons gustatifs (Yamamoto et al., 2009). En effet, une injection du transgène *Shh* chez le SF conduit non seulement à la dégénérescence de l'œil mais aussi à une augmentation du nombre de bourgeons gustatifs et de la largeur des mâchoires. A l'inverse,



**Figure 23 : Extension du territoire d'expression de *Shh* chez les CF**

Hybridation *in situ* de *Shh* chez SF (à gauche et I) et des CF (à droite et J) à 10 hpf (I-J) (Karen Pottin), 20hpf (A-B), 36hpf (C-F) et 48hpf (G-H) (Menuet et al., 2007). Abréviations : diencéphale dorsal (ddi), plaque du plancher (fp), hypothalamus (hyp), région préoptique (po), subpallium (SP), télencéphale (tel), *zona limitans intrathalamica* (zli).



**Figure 24 : Effets pléiotropiques de *Shh* et de *Prox1***

(A) La sélection naturelle peut agir directement sur les systèmes sensoriels (1) ou alors indirectement via la fonction sensorielle (2) ou via la génétique (3). (B) Les relations existant entre certaines modifications constructives et régressives sont observables chez les CF. Les flèches représentent les effets directs (traits pleins) ou indirects (pointillés). Le chevauchement des cercles représente les voies génétiques impliquées (Franz-Odenaal and Hall, 2006).

l'inhibition de la signalisation Shh chez les CF provoque une diminution du nombre de bourgeons et un rétrécissement des mâchoires.

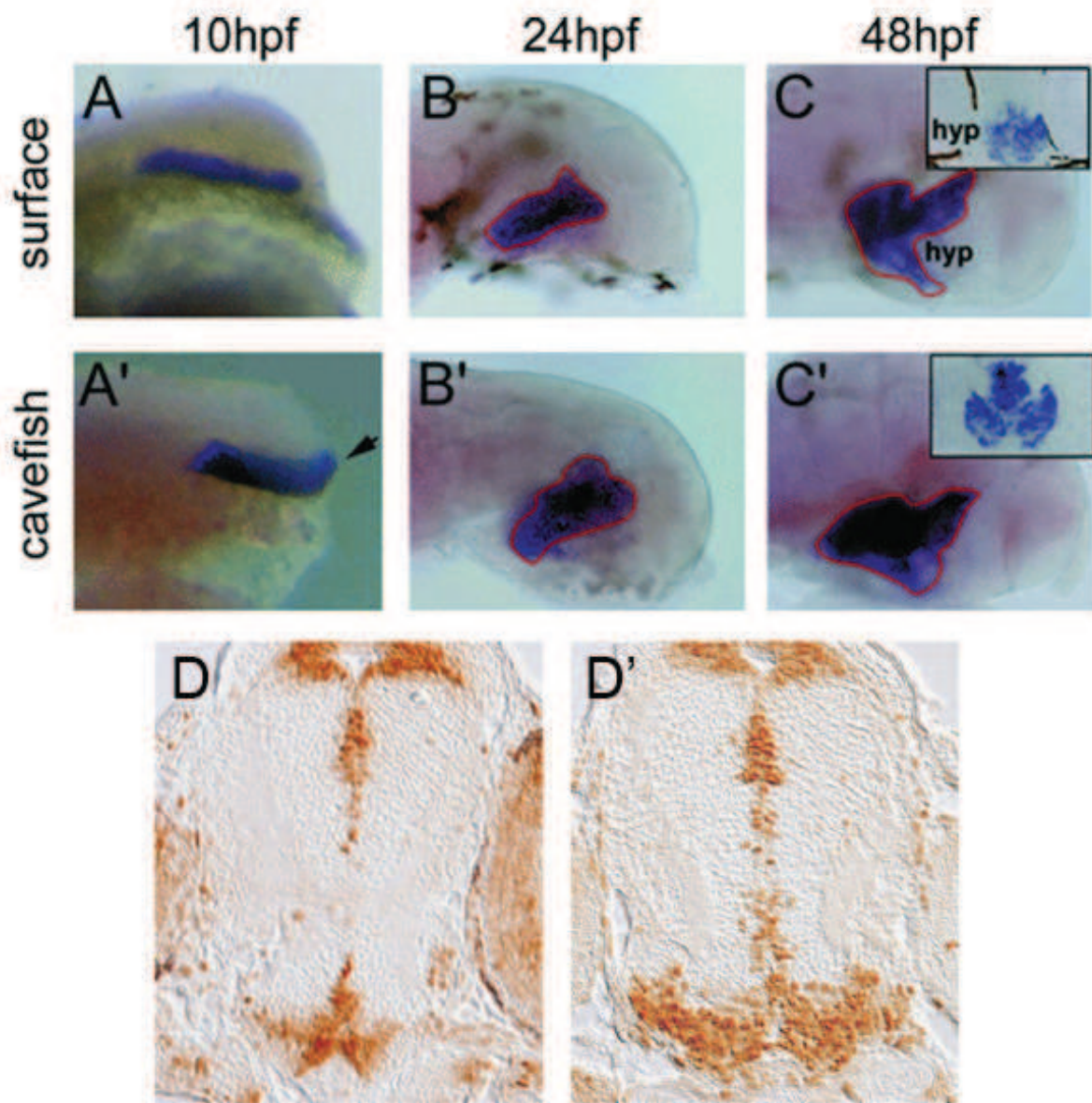
Le travail de notre équipe a permis de montrer que cette extension du domaine Shh chez le CF est maintenue tout au long du développement. Comme le montre la figure 23, cette différence est observable par hybridation *in situ* dès le développement précoce (10hpf) (Pottin et al., 2011) puis à 20, 36 et 48hpf (heures post fécondation) (Menuet et al., 2007). L'élargissement du territoire d'expression inclut tous les domaines d'expressions antérieurs de Shh, y compris la plaque du plancher, la ZLI, l'hypothalamus et le sous-pallium. Cela a des conséquences sur le développement de régions spécifiques du cerveau antérieur qui sont sous influence directe de la signalisation Shh, en partie ventrale : le télencéphale ventral et le diencephale basal.

Le facteur Shh est dit « pléiotropique » et cela pourrait expliquer les modifications de nombreuses structures, y compris la perte de l'œil, chez les CF. On définit un gène pléiotrope comme un gène affectant plusieurs structures et ayant des actions variées. Par exemple, comme le présente la figure 24, il est possible que la perte de l'œil ne soit qu'une conséquence de l'extension de Shh et permettrait d'augmenter l'efficacité d'un processus neuronal autre ou améliorerait la morphologie ou la physiologie du poisson pour lui permettre d'être mieux adapté à l'environnement cavernicole. Les gènes contrôlant la dégénérescence de l'œil contrôleraient aussi le développement d'autres structures apparemment non reliées mais qui conféreraient un avantage aux poissons vivant dans l'obscurité. De fait, on observe de légères variations dans la spécification de régions et dans les migrations de populations neuronales spécifiques (Menuet et al., 2007).

De fait, l'amplification du territoire d'expression de Shh a, entre autre, pour conséquence une extension des territoires d'expressions de ses gènes cibles.

C'est le cas par exemple du facteur de transcription *Nkx2.1a* (Menuet et al., 2007). Notre équipe a montré une extension du territoire d'expression du facteur de transcription *Nkx2.1a* chez les CF (figure 25). Ce gène spécifie le territoire de l'hypothalamus présomptif. Cette extension est bien une conséquence de l'amplification de la signalisation Shh car un





**Figure 25 : Elargissement de l'hypothalamus chez les CF**

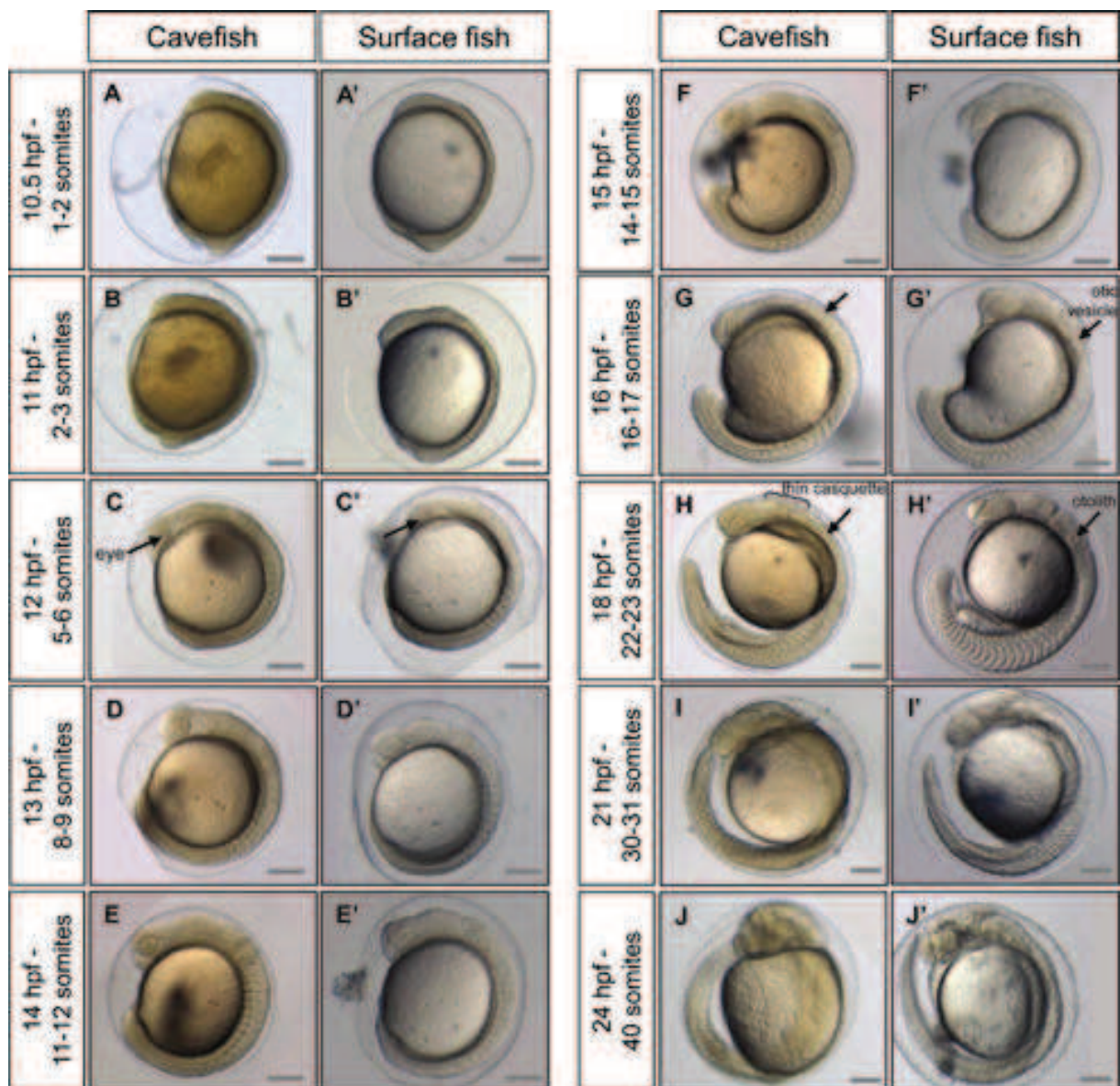
(A-C) Hybridation *in situ* *Nkx2.1a* (A-C') chez les SF (en haut) et les CF (en bas) à différents stades indiqués. Dès les stades précoces, l'expression de *Nkx2.1a* est plus large (flèche noire). Cette extension du domaine d'expression persiste tout au long du développement. Le trait rouge encercle l'expression de *Nkx2.1a* et correspond à l'hypothalamus présomptif (Rétaux et al., 2008).

(D-D') Le marquage sur coupes pour PCNA (marqueur de la prolifération cellulaire) à 60hpf est beaucoup plus important dans l'hypothalamus des CF (D') que chez les SF (D) (Menuet et al., 2007). Noter que cette augmentation de prolifération concerne exclusivement l'hypothalamus, les régions plus dorsales du thalamus et du tectum présentant des patrons de PCNA identiques chez les SF et les CF.

traitement à la cyclophamide [inhibiteur de la signalisation Shh (Chen, 2002)] permet de « ramener » le territoire d'expression de *Nkx2.1a* à l'expression plus étroite connue chez les SF (Menuet et al., 2007). Comme le montre la figure 25D, il est probable que l'élargissement de l'hypothalamus soit dû à une augmentation de la prolifération cellulaire (Menuet et al., 2007).

L'extension de Shh a également des conséquences indirectes. Par exemple, notre équipe a observé que le territoire d'expression du gène *Lhx6* est plus étendu au niveau du télencéphale et de l'hypothalamus des CF (Menuet et al., 2007). Le gène *Lhx6* est connu chez la souris pour contrôler la migration des interneurones GABAergiques du télencéphale ventral vers le télencéphale rostral et dorsal (Alifragis et al., 2004; Neves et al., 2012). Son expression est gouvernée chez les vertébrés par *Nkx2.1a*, lui-même sous contrôle de *Shh*. Or, chez l'*Astyanax*, le patron d'expression de *Lhx6* est similaire partiellement à celui de *Nkx2.1b*. Suite à l'amplification de Shh, le territoire d'expression de *Nkx2.1b* est plus étendu au niveau du subpallium et de la région préoptique des CF (Menuet et al., 2007). Le territoire d'expression de *Lhx6* est aussi plus étendu chez les CF. Or, chez la souris, un traitement à la purmorphamine [agoniste de la signalisation Shh par liaison sur le récepteur de Shh, Smoothed (Wu et al., 2004)] augmente le niveau d'expression de *Lhx6* (Nat et al., 2012). Chez le CF, un traitement à la cyclophamide diminue le territoire d'expression de *Lhx6*. L'extension du territoire d'expression de *Lhx6* chez le CF est donc une conséquence de l'amplification de la signalisation *Shh*. Cela suggère que la migration des interneurones GABAergiques vers les bulbes olfactifs est plus importante chez les CF. Une telle augmentation pourrait sous-tendre de meilleures capacités olfactives.

Malgré l'amplification de la signalisation Shh chez le CF, l'embryon et la larve présentent un cerveau fonctionnel, ce qui peut paraître étonnant en regard de la « puissance » du morphogène Hedgehog. L'équipe a suggéré que les autres centres organisateurs puissent en quelque sorte compenser et contrecarrer la sur-signalisation *Shh* chez le CF. De fait, *Fgf8* (fibroblast growth factor 8) est exprimé deux heures plus tôt dans le télencéphale dorsal du CF en fin de gastrulation (Pottin et al., 2011). D'autres interactions compensatrices se produisent probablement avec d'autres centres de signalisation (Ohkubo et al., 2002; Shimogori et al., 2004; Tole et al., 2000). Il n'en reste pas moins que l'hypothalamus de l'embryon de CF est



**Figure 26 : Comparaison du développement des SF et des CF**

Extrait de la table de développement pour les embryons CF Pachón (colonne gauche) et SF (colonne droite) (Hinaux et al., 2011). Les photographies ont été prises précisément aux heures post fécondation indiquées. Le développement embryonnaire des deux morphes est totalement synchrone.

une zone du cerveau où la morphogénèse, le « patterning » et la neurogénèse sont susceptibles d'être modifiées quantitativement et/ou qualitativement par l'augmentation de la signalisation *Shh*.

Pour résumer, il est probable que les subtiles modifications de la taille de certaines régions du système nerveux des CF vont avoir des conséquences fonctionnelles, modulant ainsi des variations dans les réponses des poissons, qu'elles soient d'ordres physiologiques ou comportementales. En particulier, l'hypothalamus est une région extrêmement importante pour le contrôle de l'homéostasie.

Les études développementales et comparées sur l'*Astyanax mexicanus* sont relativement récentes et le nombre d'outils dont nous disposons est relativement restreint, la communauté scientifique mondiale travaillant sur ce modèle étant relativement petite. Le développement d'outils, présenté ci-dessous, facilitera les études qui permettront à l'*Astyanax* de lever le voile sur des mécanismes biologiques encore inconnus à ce jour.

## **I.4 Les outils utilisables chez les *Astyanax***

### **I.4.1 Outils pour les analyses développementales**

Les *Astyanax* sont des ovipares. Les pontes des œufs se produisent généralement pendant la nuit. L'oviparité est un avantage certain pour les études développementales car le développement des embryons est externe. De plus, les œufs sont transparents ce qui facilite les observations et la réalisation de marquages histologiques (figure 26).

Les *Astyanax* se développent de façon très similaire aux autres espèces modèles poissons. Cependant, leur développement est extrêmement rapide : les larves nageuses



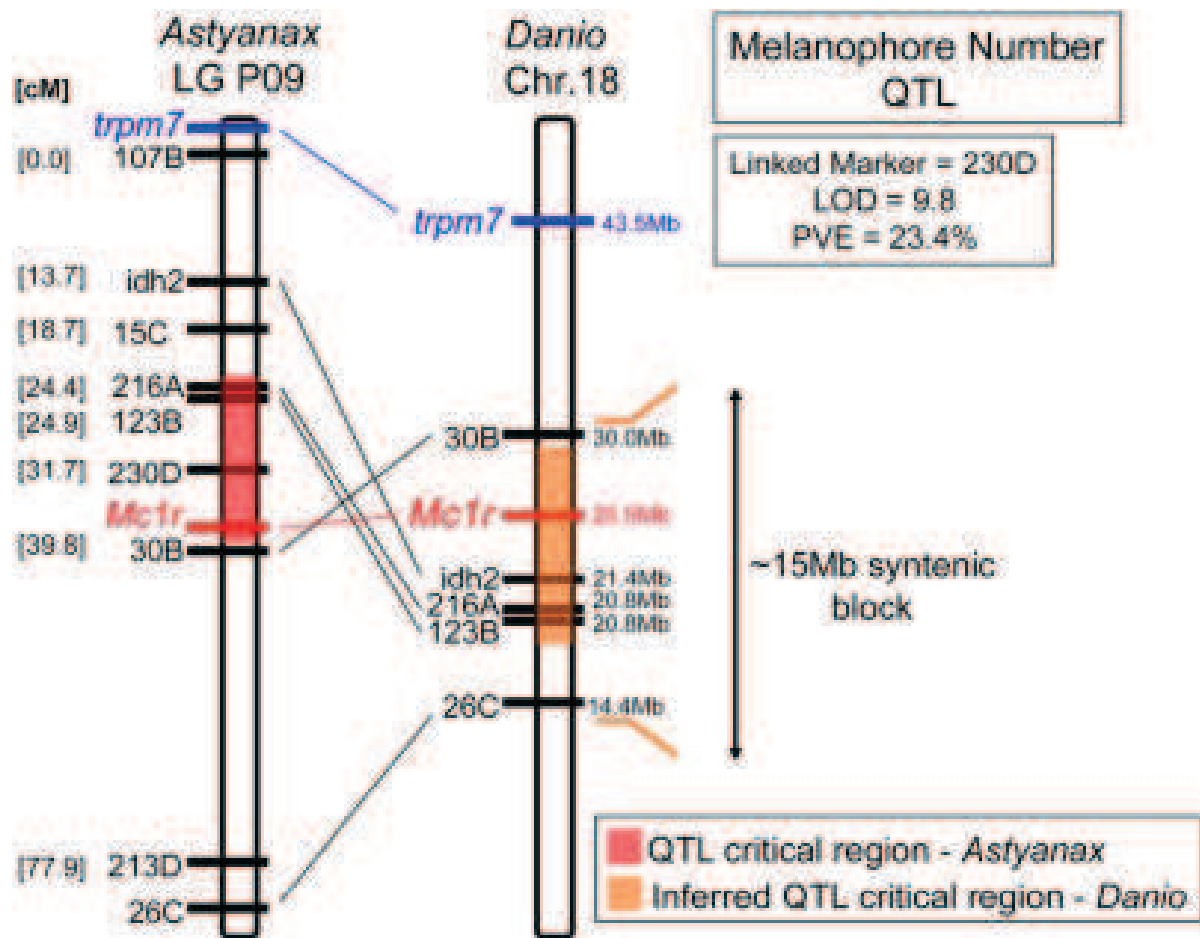
éclosent à 23°C environ 24 heures après la fécondation (alors qu'il faut compter 48 heures pour l'éclosion du *Danio rerio* et 9 jours pour le médaka *Oryzia latipes* à 28°C) (Hinaux et al., 2011; Iwamatsu, 2004; Kimmel et al., 1995).

Le développement des SF et des CF de Pachón est parfaitement synchrone. Ce point est essentiel pour comparer les deux populations pendant l'embryogénèse et les stades larvaires et pour réaliser des études « Evo-Dévo » rigoureuses (Hinaux et al., 2011).

Par ailleurs, il est facile de déchorionner les embryons, c'est-à-dire de retirer manuellement la membrane entourant l'embryon. Cette « éclosion » forcée permet de réaliser des traitements pharmacologiques pour modifier le développement des embryons car le chorion filtre les molécules le traversant et cela peut empêcher l'action de certaines drogues. C'est le cas du SU486, molécule inhibant la voie *Fgf* (Mohammadi et al., 1997).

Un autre avantage des ovipares est le nombre important d'embryons formés à chaque ponte. Dans le cas de l'*Astyanax*, une femelle peut donner jusqu'à 400 œufs. Cela permet d'avoir de grandes quantités de tests et de faire de nombreuses expériences sur des œufs issus d'une même ponte, permettant ainsi de nous affranchir des problèmes dus à la variabilité génétique inter-individuelle. De fait, le facteur génétique est inhérent au modèle car nos animaux de laboratoire sont les descendants « récents » des populations sauvages (environ cinq générations depuis le prélèvement dans le milieu naturel).

Les méthodes de fécondation *in vitro* fonctionnent parfaitement chez l'*Astyanax* (2008). Cette technique facilite la génération des hybrides mais offre aussi l'avantage de connaître avec précision l'heure de la fécondation. Cela permet d'apporter beaucoup de précision à l'exposition de traitements pharmacologiques ou encore à la détermination du stade exact d'expression de gènes impliqués dans le développement.



**Figure 27 : Exemple d'analyse QTL : le gène *Mcr1***

L'analyse des QTL impliqués dans la variation du nombre de mélanophores a permis de repérer une région critique qui possède une forte homologie avec une région du chromosome 18 du poisson zèbre. Cette région du *Danio* contient deux gènes candidats pouvant expliquer la variation phénotypique : *Mcr1* et *Tpm7*. Cependant, seul le gène *Mcr1* est contenu dans la séquence critique de l'*Astyanax*. Par conséquent, cette étude suggère que ce gène est impliqué dans la variation du nombre de mélanophores (Gross et al., 2009).

## I.4.2 Les outils génétiques

A l'heure de la rédaction de ce manuscrit, le génome de l'*Astyanax mexicanus* n'est pas connu. Cependant, un projet de séquençage pour le génome de SF et de CF de la caverne Pachón est en cours au *Genome Institute at Washington University* et (Saint Louis) les premiers résultats devraient être disponibles aux alentours de mars 2013.

En l'absence de génome, certaines études de génétique ont été réalisées sur les QTL. Un QTL est un locus de caractère quantitatif (abréviation de *Quantitative Trait Loci*). Il s'agit d'une région plus ou moins grande d'ADN qui est étroitement associée à un caractère quantitatif, c'est-à-dire une région chromosomique où sont localisés un ou plusieurs gènes à l'origine du caractère en question.

Ainsi, en étudiant la ségrégation de caractères d'intérêt au cours des générations et en corrélant le génotype et le phénotype, on est capable de déterminer le nombre et la localisation des QTL impliqués dans l'évolution d'un caractère donné.

Par exemple, l'analyse QTL de la perte de la pigmentation des CF a permis de mettre en évidence plusieurs gènes candidats, dont *Oca2* et *Mcr1* (figure 27). Un autre exemple est la dégénérescence de l'œil du CF. Les études de Protas ont permis de montrer que la perte des yeux est un caractère complexe. En effet, au moins 12 QTL sont impliqués dans ce phénotype (Borowsky, 2008a; Niven, 2008).

L'étude des populations hybrides permet également d'étudier la complémentation fonctionnelle de certains caractères. Un trait marquant est la restauration des yeux des populations hybrides de populations cavernicoles. Comme le montre la figure 5, les hybrides obtenus par des croisements de deux populations cavernicoles possèdent des yeux, bien que plus petits que ceux des poissons de surface (Borowsky, 2008a). Cette complémentation fonctionnelle montre que la perte des yeux n'est pas provoquée par des mutations au sein des





mêmes gènes chez toutes les populations cavernicoles. Cela démontre encore une fois une origine multiple des différentes populations cavernicoles.

### **I.4.3 Les outils transcriptomiques**

Notre équipe a généré des banques d'ADNc (ADN complémentaire) pour les SF et les CF de Pachón. Plusieurs banques de SF et de CF ont été générées : 6 à 16hpf, 24 à 36hpf, 48 à 60hpf et des poissons de deux semaines. Ces stades doivent permettre à la fois d'étudier le transcriptome au cours des événements majeurs du développement mais également de désigner les différentes étapes de la dégénérescence de l'œil et du cristallin chez les CF. Au total, 200 000 clones ont été séquencés et sont conservés au laboratoire, constituant une ressource précieuse pour la communauté scientifique. En utilisant ces séquences, l'équipe a pu réaliser aussi les premières comparaisons à grande échelle des séquences des différents morphotypes (Hinaux et al., 2013).

L'analyse de ces séquences montre un taux de polymorphisme plus faible dans la population CF Pachón par rapport au SF. Ce faible taux est probablement dû, d'une part, au petit nombre d'individus peuplant la caverne. Les liens de parenté entre les poissons sont forts, diminuant donc le polymorphisme. D'autre part, l'environnement cavernicole constant peut aussi provoquer des pressions qui ont sélectionné certains allèles, diminuant également le polymorphisme.

Le nombre de différences fixées dans les séquences codantes des individus des deux populations est assez faible. En revanche et de façon intéressante, une forte proportion des gènes CF mutés correspond à des gènes connus pour avoir un lien avec le développement du système visuel chez le poisson zèbre (Hinaux et al., 2013).



Au cours de ma thèse, j'ai participé à la mise en place d'outils permettant d'accroître la « puissance » du modèle *l'Astyanax*. Le développement des méthodes de transgénèse stable est rapporté dans les résultats et l'établissement de la table de développement est présenté en annexe.

Comme vous avez pu le constater, les deux types de populations *d'Astyanax mexicanus* font de cette espèce un excellent modèle pour les études de microévolution, de développement et d'évo-dévo. Cependant, mon projet de thèse concerne l'étude comparée du système nerveux et du comportement, pour laquelle les *Astyanax* s'avèrent également être des modèles de choix. Le chapitre suivant présente dans un premier temps l'évolution des idées sur l'étude du comportement animal au cours des âges puis, dans un second temps, les connaissances qui ont pu être recueillies dans ce domaine grâce à l'étude des animaux regroupés sous le terme de « poissons ».

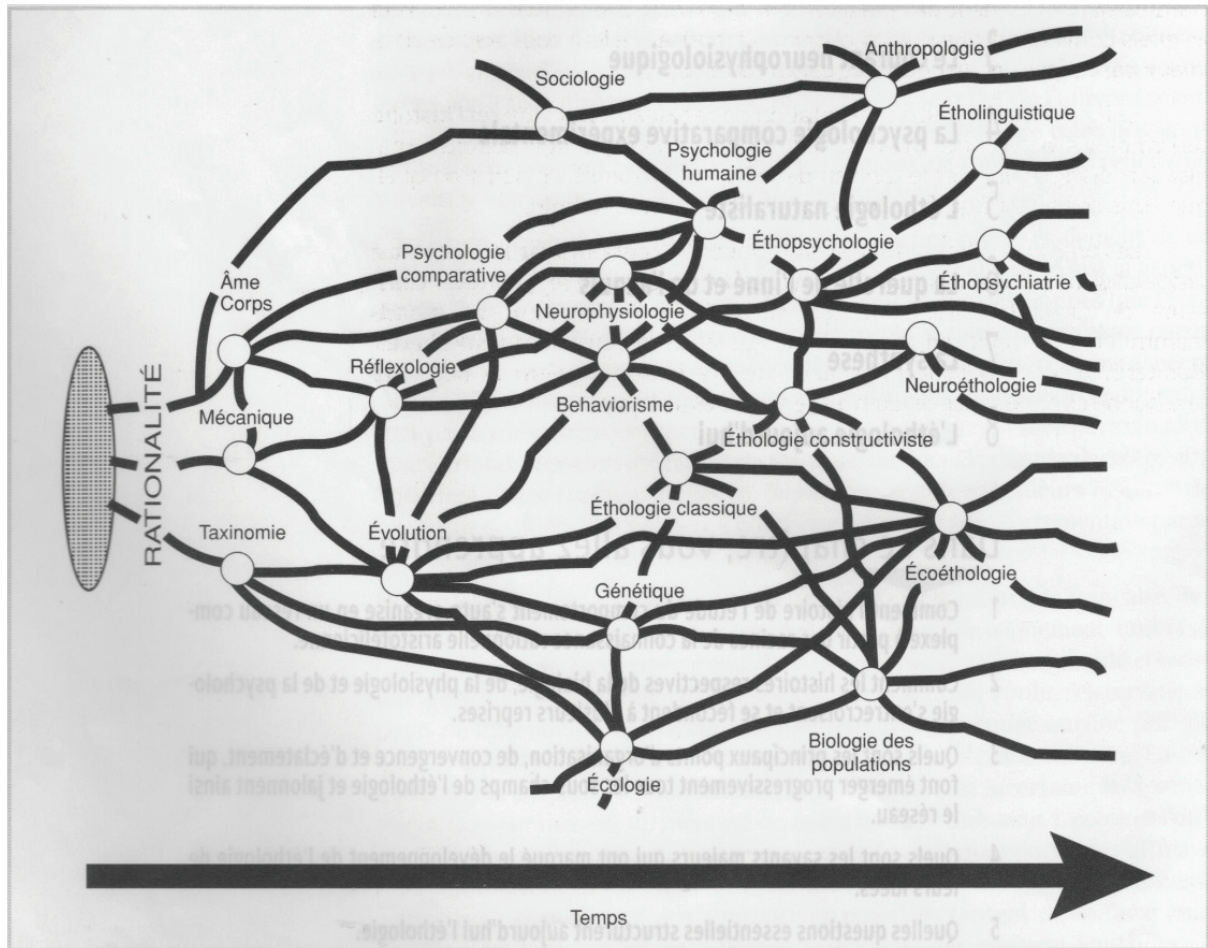
## II Le comportement animal

### II.1 Quelques éléments d'histoire de la biologie du comportement et de l'éthologie

Bien que les études scientifiques du comportement animal soient relativement récentes (XVIIIème siècle), l'homme a depuis toujours étudié le comportement animal. En effet, à l'époque préhistorique, connaître les « habitudes » des animaux permettait aux hommes d'augmenter leurs possibilités de manger tout en diminuant les risques d'être mangés.

#### II.1.1 Définitions d'un comportement

Il est difficile de donner une définition précise d'un comportement. Etymologiquement, ce terme dérive du verbe latin *comportare* qui signifie transporter. D'après le dictionnaire Larousse, *comportement* : (nom masculin) *Manière de se comporter,*



**Figure 28 : Schéma représentant l'histoire de l'éthologie et ses nœuds d'organisation**

Au cours du temps, l'étude du comportement animal a subi de nombreuses influences, générant différents courants de pensée. Le réseau résultant de ces divergences est complexe. Une partie de ce réseau est présenté ici (Campan and Scapini, 2002).

*de se conduire ; ensemble des réactions d'un individu, conduite. Psychologie/ Ensemble des réactions d'un organisme qui agit en réponse à une stimulation venue de son milieu intérieur ou du milieu extérieur et observables objectivement.* De cette définition, on peut voir qu'il existe un lien étroit entre comportement et psychologie. Pour de nombreuses personnes, l'éthologie peut être considérée comme l'étude de la « psychologie animale ».

Le terme éthologie vient du grec *ethos* qui signifie « manière d'être ». L'éthologie est donc l'étude des mœurs. D'après Konrad Lorenz, qui est considéré comme le père de l'éthologie moderne, l'éthologie est la science qui étudie le comportement, c'est-à-dire l'ensemble des manifestations motrices observables d'un individu à un moment et dans un lieu particulier, ainsi que ses déterminants physiologiques, psychologiques et environnementaux. Cependant, ce terme n'est que très récent (XIX<sup>ème</sup> siècle) et finalement il ne regroupe qu'une partie des études qui ont été menées à travers les âges, réalisées à l'origine par des naturalistes étudiant les animaux dans leur milieu naturel. L'éthologie sera développée plus loin dans ce chapitre.

Les paragraphes suivants présentent brièvement et de façon non exhaustive différents courants de pensée qui ont permis d'arriver à partir des toutes premières analyses écrites du comportement aux études actuelles.

## **II.1.2 Evolution de l'étude du comportement**

« Le comportement » est un vaste sujet d'étude qui implique différentes approches. En effet, il est possible d'une part d'observer les réactions animales dans leur milieu naturel et d'autre part de soumettre les animaux en laboratoire à des tests très simples ou au contraire complexes allant jusqu'à la résolution d'équation. C'est la raison pour laquelle on parle non pas de la science du comportement mais des sciences du comportement. Pour illustrer cela, la figure 28 présente en partie les différents domaines d'étude ayant un lien avec le comportement ainsi que leurs interconnexions. Il faut noter que dans ce schéma, l'analyse du



comportement humain est fortement liée à l'analyse du comportement animal. Cette connexion existe depuis les premières études connues.

Je voudrais présenter ci-dessous l'évolution des études du comportement animal et les différents courants de pensée qui ont existé en m'appuyant, entre autres, sur les travaux de Kolb (Kolb and Whishaw, 2002) et de Danchin (Danchin et al, 2005). Cependant, au vue de la complexité de ce domaine (illustré par la figure 28), je n'ai malheureusement développé que certains aspects des sciences du comportement, en essayant de rendre le plus objectivement et le plus fidèlement possible l'évolution de ces études. Certains auteurs ou sujets, bien qu'intéressant et méritant d'être exposé, n'ont donc pas pu être cités.

Pour trouver l'origine des premiers écrits des études du comportement, il faut remonter à la Grèce Antique. A l'époque, la majorité des études portaient à la fois sur les animaux et sur l'homme.

### ***II.1.2.1 L'étude du comportement dans le monde antique : Aristote et le mentalisme***

A cette époque, deux grandes figures cherchent à comprendre l'origine du comportement. Le premier est Platon (427-347 avant JC). Il sépare l'esprit, ce qui est à l'origine des pensées et des comportements, et le corps. Dans cette représentation, l'expérience sensorielle n'a que peu d'influence sur la connaissance car celle-ci n'est atteignable que par la raison.

Le deuxième est Aristote (384-322 avant JC). Il fonde la théorie du mentalisme. Aristote organise l'ensemble des organismes connus sur l'échelle des êtres. Cette vision donne une continuité et une complexité croissante entre les plantes végétatives, les animaux sensibles et les hommes pensants. Dans cette théorie, l'âme et le corps sont réunis, le cœur étant le siège de l'âme. La connaissance est liée à l'apprentissage des lois qui gouvernent la nature. L'âme ne peut comprendre ces règles et apprendre les bonnes réactions que grâce à l'expérience sensorielle. Cette expérience peut donc être acquise par les animaux et les





# L'HOMME DE RENE DESCARTES.

PREMIERE PARTIE.

*De la Machine de son Corps.*



Es hommes seront composez comme nous, d'une Ame & d'un Corps; Et il faut que ie vous décriue premierement le corps à part, puis apres l'ame aussi à part: Et enfin que ie vous monstre comment ces deux Natures doiuent estre iointes & vnies, pour composer des hommes qui nous ressemblent.

Ie suppose que le Corps n'est autre chose qu'une statue ou machine de Terre, que Dieu forme tout exprés, pour la rendre la plus semblable à nous qu'il est possible: En sorte que non seulement il luy donne au dehors la couleur & la figure de tous nos membres, mais aussi qu'il met au dedans toutes les pieces qui sont re-

I.  
De quelles parties doit estre composé l'homme qu'il décrit.

II.  
Que son Corps est une machine entiere-ment semblable aux nostres.

A

**Figure 29 : Extrait du *Traité de l'Homme* de Descartes**

hommes. Cela pose le schéma mental nécessaire à la compréhension du fonctionnement cognitif. Ce concept est à la base d'un autre courant de pensée : le behaviorisme. Celui-ci sera développé plus loin.

### ***II.1.2.2 Descartes et le dualisme***

C'est seulement au XVII<sup>ème</sup> siècle qu'une autre théorie vient s'opposer au mentalisme. Dans le *Traité de l'Homme*, le premier livre consacré au cerveau et au comportement, René Descartes (1595-1650) proposa une nouvelle explication du comportement qui attribuait au cerveau un rôle important. Descartes plaça le siège de l'âme dans le cerveau, précisément au niveau de la glande pinéale, et fit le lien entre le cerveau et le corps en considérant que l'âme et le corps étaient des entités séparées mais interconnectées. Le terme de dualisme vient de la séparation de ces deux entités. Dans la première phrase du *Traité de l'Homme* il explique que les êtres humains doivent être composés d'un esprit et d'un corps :

*Je dois d'abord vous décrire séparément le corps (qui comprend le cerveau) : puis également de manière séparée, l'âme ; et finalement, je dois vous montrer comment ces deux substances se doivent d'être reliées et unies pour constituer les êtres humains... (Descartes, 1664)(Figure 29)*

Pour Descartes, l'esprit commande au cerveau de faire en sorte que le corps fonctionne. Les fonctions vitales sont réalisées de manière autonome par la mécanique du corps mais tous les actes volontaires proviennent du cerveau. Pour lui, le corps fonctionne comme un automate grâce à un jeu de pression de liquide interne au corps. La glande pinéale étant proche du ventricule cérébral, il suffit de faire varier la pression du liquide pour faire fonctionner les muscles de manière volontaire. Ainsi, si un corps n'avait pas d'esprit, il aurait été incapable d'utiliser un langage ou d'avoir un raisonnement cohérent mais pourrait tout de même survivre. Cela fut l'explication des maladies mentales et cette idée est à l'origine de l'expression française « avoir perdu l'esprit ».



Descartes démarque fortement l'homme de l'animal. Les animaux n'ayant pas d'âme, ceux-ci ne sont que des automates dont les mouvements peuvent être expliqués par des principes mécaniques cartésiens. C'est la base de la théorie des « animaux-machines ».

### ***II.1.2.3 Darwin et le matérialisme***

Le dualisme de Descartes fut renversé au XIX<sup>ème</sup> siècle. Charles Darwin (1809-1882) analysa finement le comportement animal en milieu naturel et par ces travaux il modifia profondément les méthodes et les implications de l'étude du comportement. En effet, la célèbre théorie de l'évolution est également valable pour les comportements. Chaque comportement dérive d'un comportement ancestral qui a été modifié par l'adaptation et par la sélection naturelle. Tout comportement est directement contrôlé par le cerveau, sans intervention d'âme ou d'esprit ; c'est le matérialisme.

Le comportement humain dérive également des comportements ancestraux. Darwin explique dans *The expression of the emotions in Man and animal / L'expression des émotions chez l'homme et les animaux* (1872) : *Avec les humains, certaines expressions, comme le hérissements des poils sous l'effet d'une terreur extrême ou l'exhibition des dents à cause d'une rage furieuse, ne se comprennent que difficilement sauf si l'on croit que l'homme a existé un jour dans une condition très inférieure, comparable à celle de l'animal.*

A partir du matérialisme, d'autres courants d'études ont été formés pour analyser le comportement animal. Le premier courant qui en découla fut l'évolutionnisme.



#### *II.1.2.4 L'évolutionnisme*

Le terme d'évolutionnisme apparaît vers la moitié du XIX<sup>ème</sup> siècle. Le père de l'évolutionnisme est Herbert Spencer (1820-1903). Pour lui, l'évolution est un phénomène qui transforme forcément les éléments dans le sens d'une différenciation et d'une organisation croissante, de l'incohérence vers la cohérence. Ainsi, l'homme des cavernes ne vivait que de la chasse et de la cueillette dans une époque de « sauvagerie ». Puis, à l'époque de la « barbarie », les hommes ont appris l'art de l'agriculture et de l'élevage. Enfin, l'époque de la civilisation arriva avec l'apparition du commerce, de l'industrie et de la science.

Spencer s'opposa à Darwin sur de nombreux points. De cette confrontation naquirent deux grands schémas de pensée. D'une part, Alfred Espinas (1844-1922) suivit le raisonnement de Spencer. Il proposa de regrouper les sociétés animales suivant leurs fonctions et non selon la taxinomie de l'espèce. Les sociétés animales sont donc classées selon l'avantage qu'elles procurent aux individus (Espinas, 1878). Par exemple, le regroupement des femelles hippopotames autour d'un mâle a pour rôle la reproduction et la protection des petits alors que dans le cas des lionnes, les regroupements ont aussi un rôle alimentaire car elles chassent ensemble. Le classement se fait également en fonction de l'environnement naturel dans lesquels les sociétés évoluent. Ce concept est à la base de la socioécologie.

D'autre part, le cheminement de pensée de Darwin fut suivi entre autre par George John Romanes (1848-1894). Pour lui, le comportement des animaux est analogue à celui des humains et les états mentaux sont aussi présents chez les animaux. Par exemple, les poissons peuvent être jaloux et en colère alors que les oiseaux ressentent de la fierté et les singes peuvent ressentir de la honte et des remords en cas de mauvais comportement de leur part. (Romanes, 1888).



Le principal « défaut » de ces courants de pensée est que le but final est de calquer les observations effectuées directement sur la société humaine afin de mieux la comprendre. Cela a pour conséquence d'entacher les études du comportement animal par de l'anthropomorphisme. Cela conduit rapidement à une opposition forte de la part d'un groupe de personnes qui sont à l'origine du behaviorisme.

#### ***II.1.2.5 Le behaviorisme***

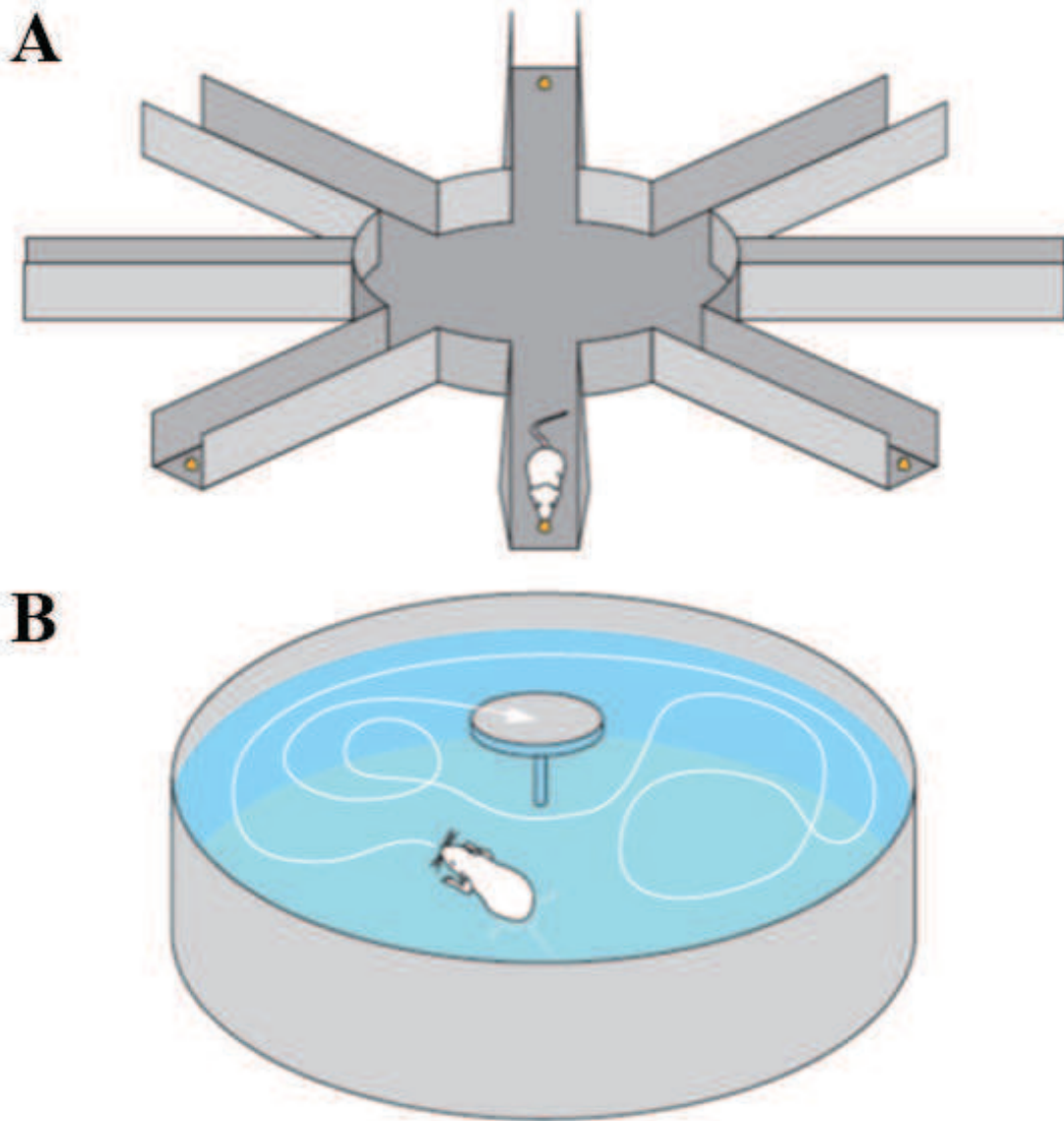
Conwy Llyod Morgan (1852-1936) pose les bases du behaviorisme en publiant *An introduction to comparative psychology*. Dans cet ouvrage, il décrit le concept que l'on appellera plus tard le canon de Morgan.

Le canon de Morgan fonctionne comme le principe de parcimonie, c'est-à-dire qu'il faut privilégier les hypothèses les moins coûteuses en terme de présupposition. Cela a pour effet d'éliminer les facteurs d'émotions et de sentiments, limitant ainsi l'anthropomorphisme.

Ainsi, le behaviorisme se rapproche de Descartes et du mécanisme. Ces études ne s'intéressent pas aux circuits sous-jacents des comportements mais s'intéressent principalement aux mécanismes de l'apprentissage. Elles établissent des connexions entre les différents stimuli et les réponses occasionnées. Selon Edward Lee Thorndike (1874-1949), l'apprentissage se fait via un système « essai-erreur avec succès accidentel ». C'est-à-dire que lorsque un animal est face à un problème, il tentera différentes solutions au hasard pour résoudre le problème jusqu'à trouver l'action qui permet de le résoudre. Par la suite, l'animal mimera ces gestes lorsqu'il sera de nouveau confronté à une situation similaire.

Pour les opposants du behaviorisme, les études sont réalisées dans des conditions de laboratoire extrêmement contrôlées et dans des situations trop simples comparées à l'environnement naturel. De plus, les études sont menées sur un très faible nombre d'espèces, tel que le rat, la souris et la grenouille, qui ne posent pas de problème pour l'élevage en laboratoire. Par ailleurs, le behaviorisme est par certains aspects trop réductionniste pour





**Figure 30 : Exemples de tests étudiant la localisation spatiale**

Les deux tests illustrés sont fréquemment utilisés chez le rongeur. Il s'agit du labyrinthe radial de Olton (A) et de la piscine de Morris (B). Figure d'après (Zugaro, 2001).

permettre d'expliquer l'ensemble des comportements observables. Ses détracteurs ont alors eu recours à un autre courant de pensée, le cognitivisme.

### *II.1.2.6 Le cognitivisme*

Le cognitivisme est un courant de pensée qui accepte l'existence de processus internes à l'animal et non observables qui permettent l'intégration d'informations extraites de l'environnement. Edward Tolman (1886-1959) est l'un des fondateurs du cognitivisme. En refusant de réduire la flexibilité du comportement animal à une chaîne de stimuli/réponse, il démontre que l'animal réagit dans un but précis. Par exemple, la majorité des animaux sauvages, hors période de chasse, n'attaqueront pas s'il y a possibilité de fuir. L'agression n'est qu'une solution de dernier recours. Par ces travaux, Tolman démontra qu'un rat placé dans un labyrinthe allait en faire une carte cognitive.

*We believe that in the course of learning, something like a field map of the environment gets established in the rat's brain ... the incoming impulses are usually worked over and elaborated into a tentative cognitive-like map of the environment. And it is this tentative map, indicating routes and paths and environmental relationships, which finally determines what responses, if any, the animal will release.* D'après (TOLMAN, 1948)

*Au cours de l'apprentissage, quelque chose comme une carte d'état-major de l'environnement s'établit dans le cerveau du rat (...) s'élaborant en une carte cognitive "à l'essai" de l'environnement. Et c'est cette carte temporaire, indiquant les routes et les relations environnementales, qui finalement détermine quelles réponses potentielles l'animal va pouvoir donner.*

Il posa ainsi les bases des études de localisation spatiale. Ce sujet a été repris par David Olton. A l'aide d'un labyrinthe radial (figure 30A), il a montré que le rat mémorise les bras qu'il a déjà visité afin de rechercher plus efficacement les récompenses alimentaires



(Olton and Samuelson, 1976). Le célèbre test utilisé à l'heure actuelle pour étudier la mise en place de ces cartes est la piscine de Morris (figure 30B) (Morris, 1981).

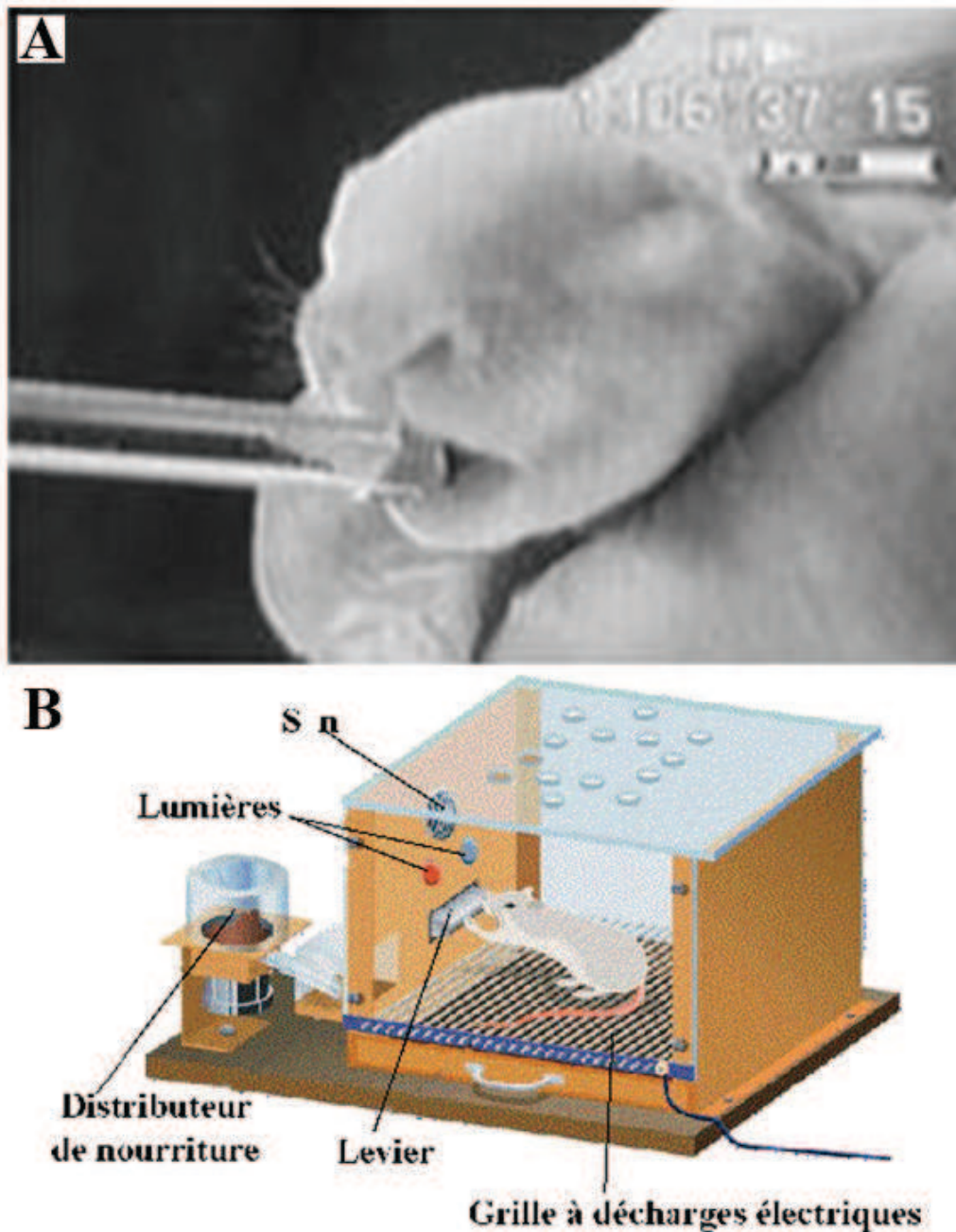
### ***II.1.2.7 La réflexologie***

Comment parler du comportement animal sans présenter les travaux d'Ivan Pavlov ? Ivan Pavlov (1849-1936) fut un médecin et physiologiste russe. Il réalisa des expériences sur la fonction gastrique du chien en mesurant et analysant la salive produite dans différentes conditions. C'est suite à ces travaux qu'il reçut le prix Nobel de médecine en 1904 « *en reconnaissance de son travail sur la physiologie digestive, grâce auquel la connaissance sur les aspects vitaux du sujet a été transformée et élargie.* »

Ayant remarqué que les chiens avaient tendance à saliver avant d'entrer réellement en contact avec les aliments, il décida d'étudier finement cette réaction. En variant les stimuli précédant la présentation des aliments, il se rendit compte que le chien, « sachant » que la nourriture allait arriver lorsque les stimuli étaient présents, se mettait à saliver avant tout contact avec la nourriture. C'est ainsi qu'il découvrit les principes de l'acquisition des « réflexes conditionnels » - c'est-à-dire, les réponses réflexes, comme la salivation, qui ne se produisent que de façon conditionnelle dans des conditions expérimentales spécifiques chez l'animal.

Une anecdote de l'histoire des sciences est que Pavlov utilisa les termes « réflexe conditionnel » qui fut mal traduit du russe et que les scientifiques découvrirent comme « réflexe conditionné ». C'est la raison pour laquelle on parle de conditionnement d'un animal.

D'un point de vue des courants de pensée, le conditionnement et le réflexe conditionnel de Pavlov permettaient de reprendre la suite du concept du behaviorisme où un comportement est une réponse donnée à un stimulus précis, stimulus qui, dans le cas présent, a été appris par expérience.



**Figure 31 : Comportement inné et acquis**

(A) Le comportement de tétée du lapereau est un réflexe. La détection de phéromones (présentes naturellement dans le lait maternel) déclenche ce comportement. Ainsi, en approchant une tige de verre préalablement enrobée de phéromones, le lapereau attrape le tube et essaye de téter (B) A l'inverse, le rat dans la boîte de Skinner effectue un comportement acquis. Après un conditionnement opérant, le rat est capable d'activer un levier en présence d'un signal lumineux et/ou sonore afin d'obtenir une récompense alimentaire.

Source des illustrations : (A) [www.cuniculture.info](http://www.cuniculture.info) ; (B) [www.oocities.org](http://www.oocities.org)

### *II.1.2.8 Le conditionnement Skinnerien*

Les études de Skinner (1904-1990) contribuent à l'analyse et la modification du comportement des animaux en fonction de l'environnement auquel ils sont exposés.

Le conditionnement de Skinner est aussi appelé conditionnement opérant. C'est le cas lorsque l'animal peut interagir sur son environnement. Par exemple, comme le montre la figure 31B, un animal peut apprendre à appuyer sur un levier lorsque celui-ci reçoit une récompense en retour, même si cette dernière n'arrive pas systématiquement. On parle alors d'un « renforcement » de ce comportement. L'animal peut apprendre à ne réaliser l'action que dans certaines conditions (si le voyant vert s'allume et/ou si un signal sonore est émis). A l'inverse, certaines actions peuvent être inhibées lorsque la réponse est aversive pour l'animal (jet d'eau ou d'air, choc électrique, ...). On parle alors non pas de « renforcement » mais de « punition ».

Les différents mécanismes d'addictions proviennent directement des conditionnements opérant. Par exemple, en cas de manque de nicotine, le fumeur va ressentir le besoin de fumer car ce geste lui procure habituellement « la récompense », à savoir une dose de nicotine dans ce cas. Skinner montra également qu'il en est de même pour les superstitions. De fait, lorsque des pigeons sont isolés et nourris à des intervalles de temps extrêmement réguliers, ceux-ci vont développer naturellement différents comportements qui leur seront personnels. Par la suite, ils répéteront les « comportements superstitieux » pour obtenir de la nourriture.

Ces travaux s'opposent au réflexe pavlovien car ici l'apprentissage n'est pas passif mais au contraire actif. Les actions volontaires ne sont donc pas exclusivement des réflexes physiologiques mais elles peuvent aussi être conditionnées activement par l'animal. Ce genre de conditionnement s'inscrit directement dans la démarche behavioriste.



**Figure 32 : Comportement acquis en milieu naturel : cas de la mésange**

Les mésanges avaient appris à percer la capsule en carton qui fermait les bouteilles de lait. Ainsi, dans les années 20, elles suivaient les livreurs de lait pour boire la crème avant que les bouteilles ne soient récupérées.

Source de l'illustration : [www.des-abeilles-dans-mon-jardin.over-blog.com](http://www.des-abeilles-dans-mon-jardin.over-blog.com)

### ***II.1.2.9 La confrontation de l'inné et de l'acquis***

Parmi les comportements, deux grandes classifications existent et ont été à l'origine de nombreux débats. Ce sont les comportements dits innés et ceux dits acquis.

On peut définir un comportement inné comme faisant partie de l'instinct. Il est observable sans apprentissage préalable des individus et il est stéréotypé, c'est-à-dire qu'il est retrouvé de manière très semblable chez tous les individus d'une même espèce. Ces comportements sont héréditaires et dépendent du patrimoine génétique de l'individu. C'est le cas par exemple du phototaxisme des insectes volants attirés par les sources lumineuses ou encore le comportement de tétée des lapereaux qui est déclenché par les phéromones de la mère, contenu dans le lait (figure 31A).

Au contraire, un comportement est acquis lorsqu'il est réalisé à la suite d'un apprentissage et que la répétition de ce comportement permet d'améliorer la performance. Les comportements d'imitation, de conditionnement pavlovien ou encore d'essai-erreur de Thorndike sont des cas de ces comportements acquis et sont à l'origine de la transmission des « traditions » des animaux. Un exemple célèbre d'apprentissage « essai-erreur » réalisé dans le milieu naturel est le cas des mésanges qui, dans les années 1920, suivaient à distance la tournée des laitiers britanniques qui déposaient les bouteilles de lait aux portes des habitations. Une fois le laitier parti, les mésanges perçaient à l'aide de leur bec la capsule de carton et elle pouvait boire la crème qui était au dessus du lait (figure 32). Très rapidement, toutes les mésanges charbonnières et bleues britanniques apprirent cette technique et cette tradition fut reprise par la descendance, les petits imitant les adultes. (Hawkins, 1950).

Bien que les théories d'inné et d'acquis se soient confrontées pendant de nombreuses années, il est clair aujourd'hui que ces deux types de comportements existent et cohabitent au sein du règne animal (comme le montre la figure 31). D'après Konrad Lorenz, « *C'est une grande erreur d'opposer l'inné et l'acquis comme des réalités contradictoires, à la façon d'un jeu à somme nulle où tout ce qui est gagné par l'un est automatiquement perdu par l'autre. L'inné et l'acquis se combinent en*





*permanence, si bien qu'aucune de ces deux notions ne peut être conçue indépendamment de l'autre ».*

Par exemple, la nidification du tisserin à capuchon (*Ploceus cucullatus*) est un processus complexe et des études ont montré qu'il s'agissait d'un comportement inné, les petits étant toujours capables de construire un nid même s'ils étaient élevés artificiellement par des canaris pendant quatre générations, mais qu'il avait une composante acquise, les oiseaux élevés par leurs parents dans ce genre de nid réalisant des constructions plus précises et plus rapidement.

#### ***II.1.2.10 L'éthologie***

L'éthologie est née à partir des idées des naturalistes qui pensaient que les études des behavioristes n'étaient pas capables de percevoir la complexité des mœurs animales en conditions naturelles. De plus, ils accusaient la captivité et la domestication des animaux utilisés en laboratoire d'avoir dénaturé le comportement par rapport aux individus restés à l'état sauvage. L'éthologie se veut donc l'étude biologique du comportement animal sauvage avec une approche à la fois naturaliste et évolutionniste. Ce terme a été utilisé la première fois par Isidore Geoffroy de Saint Hilaire (1805-1861) pour désigner l'étude de la manière d'être des animaux sauvages.

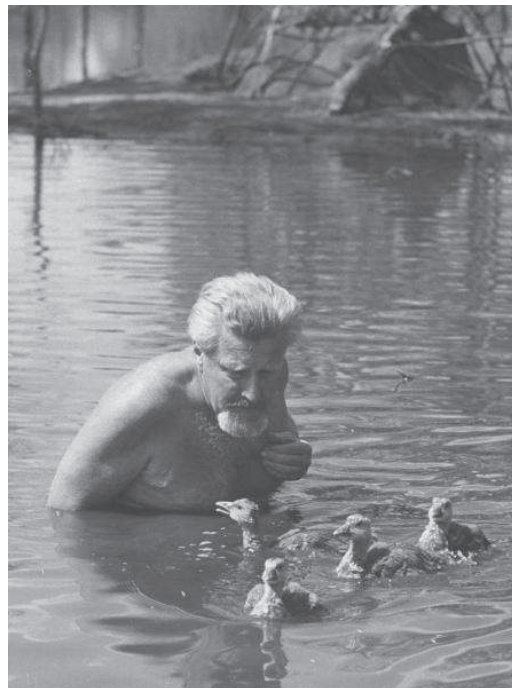
L'éthologie regroupe de nombreuses techniques d'étude, de l'analyse des comportements instinctifs spécifiques (Oskar Heinroth), de l'étude comparée de comportements interspécifiques ou de ritualisation (étude des parades nuptiales, ...). Ne pouvant présenter l'intégralité de l'éthologie, je vais principalement développer les éléments formant aujourd'hui ce que l'on nomme l'éthologie moderne.



**Figure 33 : Comportement nuptial du grèbe huppé**

Lors de la parade nuptiale, le couple de grèbes huppés mime les rites de construction des nids. Ainsi, le mâle et la femelle plongent et remontent en surface avec des débris de végétaux (B), matières premières du nid (A).

Source de l'illustration : [www.biolib.cz](http://www.biolib.cz) (A), [www.ibc.lynxeds.com](http://www.ibc.lynxeds.com) (B)



**Figure 34 : Konrad Lorenz**

Konrad Lorenz fut le premier à découvrir « l'empreinte ».

Source de l'illustration : [www.dabase.org](http://www.dabase.org)

L'éthologie moderne est apparue dans les années 1930 avec la création de l'école objectiviste, formée principalement par l'allemand Konrad Lorenz (1903-1989) (figure 34) et le hollandais Nikolaas Tinbergen (1907-1988). L'objectivisme cherche à observer les animaux dans leur environnement naturel ou en laboratoire dans des conditions se rapprochant le plus possible de la nature. Leurs travaux permirent d'identifier deux niveaux d'intégration, les causalités (physiologiques et ontogénétiques) et les valeurs (adaptatives et évolutives).

La causalité physiologique peut être définie comme l'ensemble des mécanismes directement impliqués dans l'exécution d'un comportement. Par exemple, le sommeil est un comportement qui est régulé par les variations de l'expression et de la synthèse protéique des différents intervenants du rythme circadien, eux mêmes induits par la glande pinéale qui intègre l'information « présence de lumière » au cours de la journée. La causalité ontogénétique est quant à elle l'évolution d'un comportement en fonction de l'expérience de l'individu. Par exemple, on peut observer une modification du comportement exploratoire d'une souris selon qu'elle ait grandi dans un environnement dit « riche » ou « appauvri ».

La valeur adaptative est définie par les conséquences du comportement sur le sujet et sur l'environnement. Par exemple, le changement de coloration des poissons *Tilapia mariae* ou des *Haplochromis burtoni* permet aux autres poissons de savoir qu'ils gardent farouchement leurs territoires à cause de la présence d'œufs et que tous les intrus seront attaqués (Fernald, 2003). Par ailleurs, l'évolution du comportement est définie par l'origine du comportement dans l'histoire évolutive de l'espèce. Par exemple, l'oiseau aquatique nommé grèbe huppé *Podiceps cristatus* a une parade nuptiale particulièrement intéressante. Elle consiste en un face à face entre le mâle et la femelle où chacun plonge et refait surface en tenant à chaque fois des morceaux de végétation (<http://www.oiseaux.net/oiseaux/grebe.huppe.html> et figure 33). Ici, on peut supposer que ce comportement dérive de l'activité de construction du nid et a acquis au cours de l'évolution de l'espèce un rôle significatif dans la sélection sexuelle.

A partir de la deuxième moitié des années 30, Lorenz explore le principe d'imprégnation, c'est-à-dire la réalisation d'une empreinte, sur les oies cendrées. Par définition, l'empreinte est la capacité d'acquisition rapide et de façon permanente par un



juvénile des caractéristiques d'une forme spécifique qui orientera les conduites ultérieures (lien affectif, choix du partenaire sexuel...). Cette empreinte peut être réalisée par l'oiseau sur un objet ou plus généralement sur un autre animal. En fait, il existe une période courte pendant la vie des oiseaux où ceux-ci sont réceptifs à cette empreinte. En retirant les petits du nid pendant cette période, Konrad Lorenz est devenu « l'image maternelle » pour ces poussins. Par la suite, ceux-ci le suivirent sans jamais perdre cette empreinte qui fut décrite comme irréversible (Campan and Scapini, 2002).

Avec Karl Von Frish, qui étudia finement les systèmes sensoriels des abeilles et découvrit la communication complexe de la danse de l'abeille, Konrad Lorenz et Nikolaas Tinbergen reçurent le prix Nobel de médecine et de physiologie en 1973 pour *leurs découvertes concernant l'organisation et l'incitation des comportements individuels et sociaux*.

#### ***II.1.2.11 Ecologie comportementale***

Jusqu'à ce jour, l'écologie et surtout la biologie des populations n'étaient pas vraiment prises en compte dans les études du comportement animal. La réciproque était également vraie. L'écologie comportementale a vu le jour par la réunion de ces trois approches avec l'avènement de la sociobiologie. Celle-ci fut popularisée par Edward Wilson dans son ouvrage de 1975, *Sociobiology, the new synthesis* (Wilson, 1975). Pour lui, l'étude du comportement animal doit se situer entre la neurophysiologie et l'écologie comportementale. Ce schéma de pensée s'appuie fortement sur la théorie du néodarwinisme qui peut être définie simplement comme une extension de la théorie de l'évolution de Darwin modifiée par l'apport des connaissances actuelles de l'hérédité et de la génétique.

L'écologie comportementale est donc le regroupement de l'éthologie et de la psychologie comparative. Elle part du principe qu'il existe des gènes qui influencent le comportement et que la sélection naturelle est en réalité un processus d'optimisation sous contrainte. Ici, le but du comportement est d'optimiser la « fitness » des animaux, c'est-à-dire

	<b>Ethologie</b>	<b>Ecologie comportementale</b>
<b>Origine géographique principale</b>	Europe	Amérique du Nord
<b>Objet principal d'étude</b>	Comportement inné (instinct)	Comportement acquis (apprentissage)
<b>Situation d'étude</b>	Environnement naturel ou fidèlement reconstitué	Dispositif expérimental volontairement simplifié
<b>Degré de contrôle des sujets</b>	Minimal	Rigoureux
<b>Modèles biologiques favoris</b>	Espèces prisées par les naturalistes : insectes, oiseaux, poissons	Rongeurs, pigeons, humains
<b>Type de mesure</b>	Enregistrement détaillé des éléments comportementaux	Réponses simples objectives (par exemple, la pression exercée sur un levier)
<b>Formulation des questions</b>	Raisonnement inductif (l'hypothèse suit l'observation)	Raisonnement hypothético-déductif (l'hypothèse, souvent générée par des modèles, précède l'observation)
<b>Méthodologie</b>	Description et quantification détaillées du comportement	Mesure d'une performance, approches expérimentales, utilisation d'outils moléculaires
<b>Système explicatif</b>	Réductif, structural, adaptationniste	Adaptationniste
<b>Niveau de sélection</b>	Le plus souvent, espèce, groupe	Individu, gène
<b>Prise en compte de la génétique</b>	Faible (croisement hybrides)	Faible (utilisation de modèles théoriques et d'outils moléculaires)
<b>Prise en compte du développement</b>	Forte	Faible

**Figure 35 : Tableau comparatif de l'éthologie et de l'écologie comportementale**

D'après (Danchin et al, 2005).

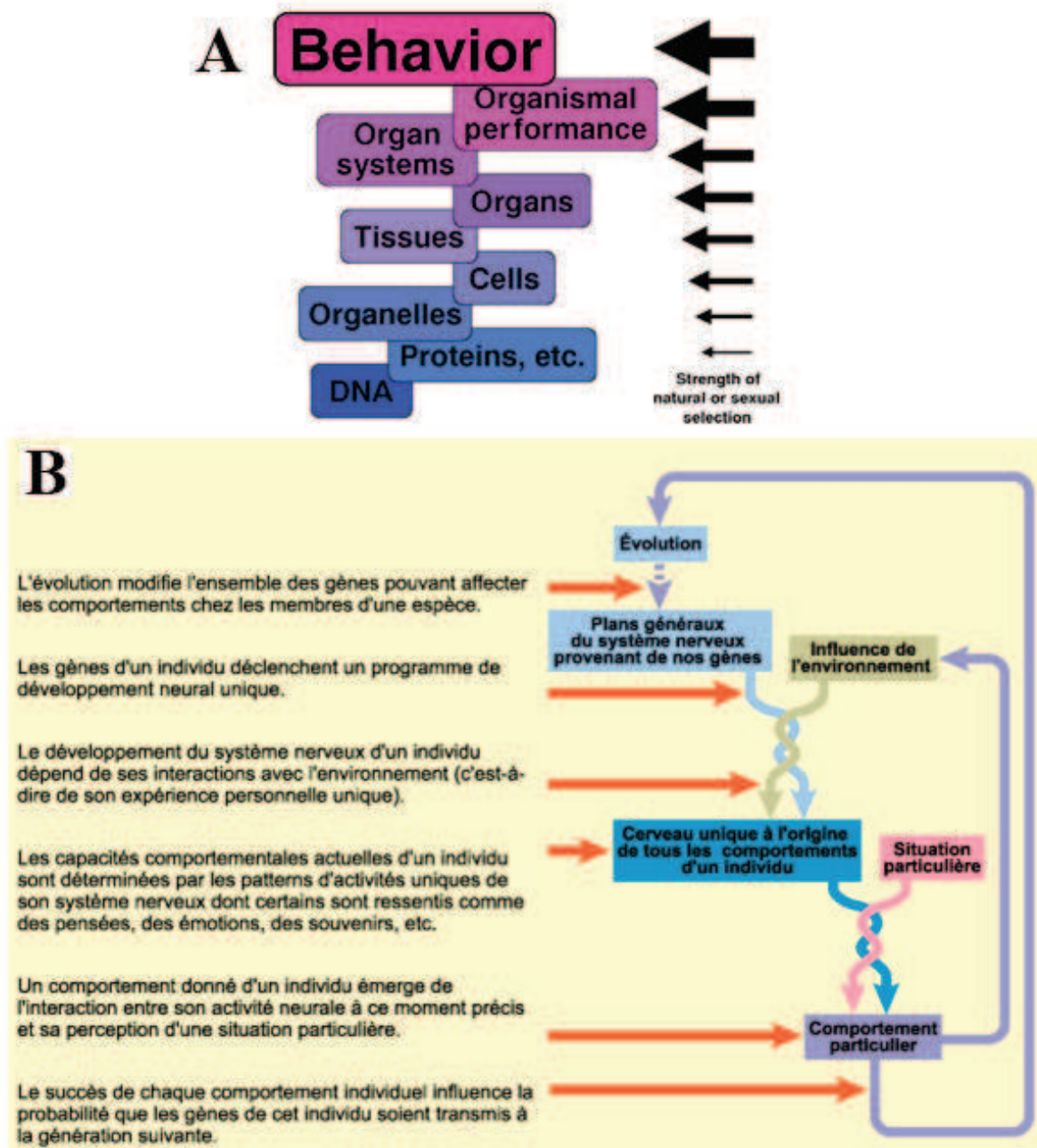
leurs aptitudes à grandir et à se reproduire. On peut étudier le comportement pour comprendre les mécanismes d'action de la sélection naturelle.

Comme l'explique Frank Cézilly dans « Ecologie comportementale » (Danchin et al, 2005), il ne faut pas voir l'étude du comportement animal comme une discipline mais plutôt comme plusieurs. « *D'un point de vue de l'histoire des sciences du comportement, on peut ainsi se demander si l'écologie comportementale ne constitue qu'un prolongement d'autres disciplines auxquelles elle succède à l'intérieur de ce qu'il est convenu d'appeler les sciences du comportement, ou si elle s'en démarque irrémédiablement par une réorganisation en profondeur des contenus théoriques* ». Pour Wilson, l'écologie comportementale est le futur de toute étude du comportement animal. « *La vieille éthologie disparaîtra, cannibalisée par l'Ecologie Comportementale et les neurosciences* ».

Comme le présente la figure 35, il existe une grande différence entre l'éthologie et l'écologie comportementale au niveau de l'interprétation et de l'intégration de l'observation du comportement. Là où l'éthologiste examine l'intégralité du comportement des animaux puis à partir de ces observations va rechercher les hypothèses permettant de les intégrer dans un modèle adaptatif et cognitif, l'écologie comportementale va suivre un raisonnement hypothético-déductif en émettant des hypothèses a priori puis les testant en analysant certains comportements des animaux sauvages ou de laboratoire.

Les études que j'ai réalisées sur le comportement des *Astyanax mexicanus* peuvent être vues comme un projet d'écologie comportementale. En effet, j'ai suivi au cours de mes travaux un raisonnement de type hypothético-déductif couplé avec des approches expérimentales où des outils pharmacologiques ont été utilisés en laboratoire pour comprendre l'origine « cognitive » des comportements étudiés. Cependant, l'*Astyanax*, grâce à l'existence des deux types de populations et à l'adaptation et la vie cavernicole induite en grande partie par des modifications des voies du développement, permet de réaliser des études comportementales se rapprochant de l'éthologie classique. Cela fait de ce poisson un excellent modèle pour déterminer la valeur évolutive d'un comportement donné.





**Figure 36 : Evolution des comportements et sélection naturelle**

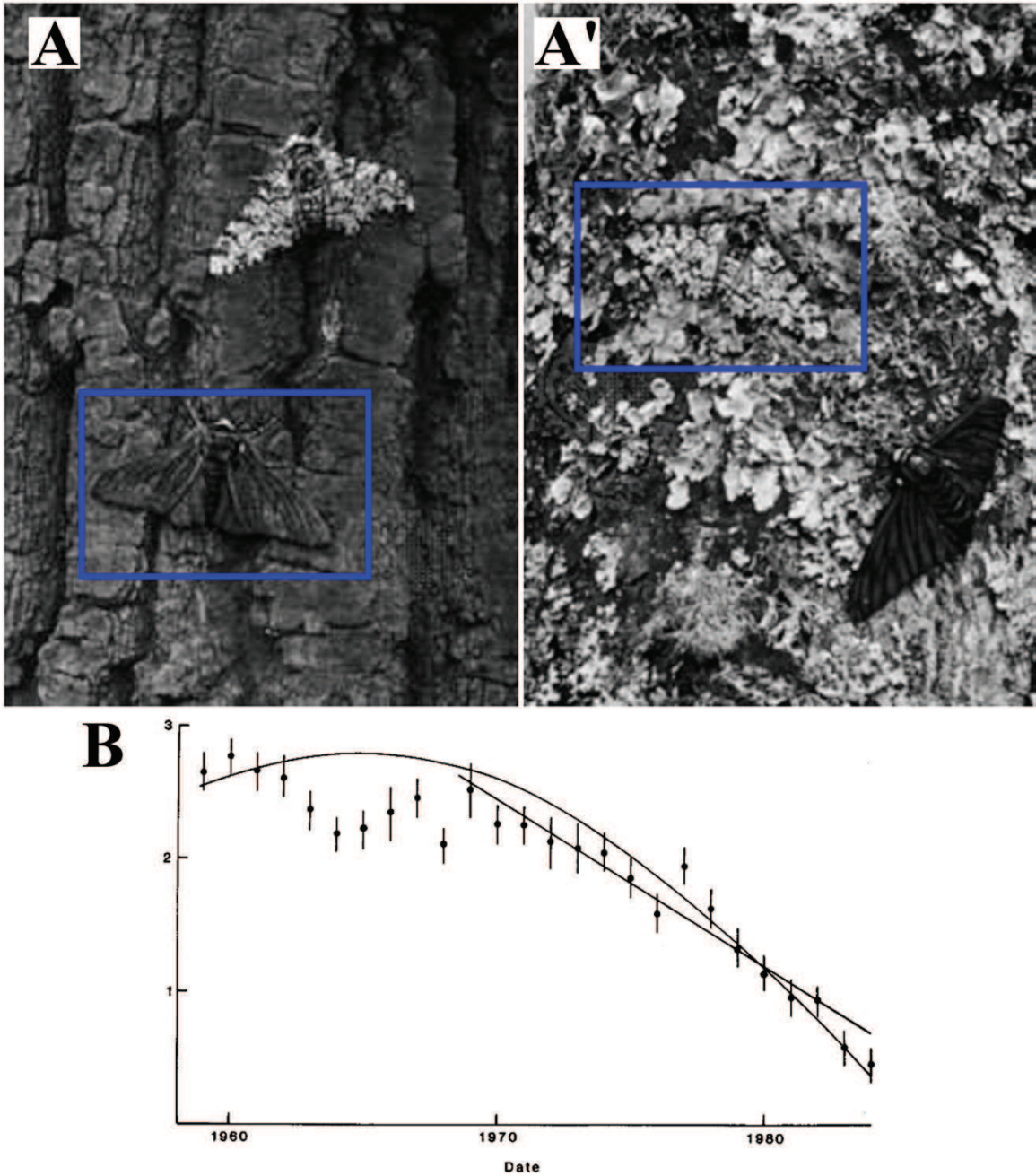
(A) Le comportement et ses niveaux sous-jacents en relation avec l'intensité de la sélection naturelle (Garland and Kelly, 2006). (B) Relations et boucles régulatrices existant entre l'évolution, l'environnement et le comportement.

Source : [www.lecerveau.mcgill.ca](http://www.lecerveau.mcgill.ca) (B)

## II.2 Lien entre l'évolution et le comportement

La sélection naturelle ou faite par l'homme favorise la mise en place de caractères définis dans une population donnée. La variance phénotypique d'un caractère dans une population est causée par la ségrégation des allèles et à leur proximité génétique à d'autres allèles eux-mêmes soumis à la sélection (Garland and Kelly, 2006). Elle favorise des allèles qui permettent l'augmentation de la plasticité phénotypique des caractères sélectionnés. La plasticité phénotypique peut être définie comme la capacité d'un génotype de produire plus d'un phénotype lorsqu'il est exposé à des environnements différents. Comme le montre la figure 36, le phénotype d'un individu est lié à son génotype et à son environnement. Lorsque l'environnement varie, le phénotype se modifie dans la mesure de la flexibilité imposée par le génotype. Lorsque la combinaison allélique permet une modification des organes et conduit à un comportement adapté à l'environnement, les probabilités de reproduction de l'individu sont augmentées. Ainsi, grâce à la sélection sexuelle, le comportement réalise un rétrocontrôle sur le génome, conduisant à une évolution de ce dernier.

Le cas de la phalène du bouleau *Biston betularia* est un excellent exemple (Clarke and Sheppard, 1964; Kettlewell, 1955). C'est un papillon qui, pour se protéger de la prédation, utilise le mimétisme. Il existe différents phénotypes naturellement. En Angleterre, la forme « insularia », majoritaire de ces papillons, est claire et, comme le montre la figure 37A, celle-ci est quasiment indétectable lorsqu'elle est posée sur l'écorce d'un bouleau. Au contraire, la forme sombre minoritaire « carbonaria » est visible dans les mêmes conditions. Dans les années 1950, suite à l'aire industrielle et l'augmentation de la pollution, l'écorce des bouleaux s'est assombrie. La forme insularia était alors beaucoup plus repérable par les oiseaux (Kettlewell, 1955). Ainsi, la fréquence d'apparition de la forme carbonaria devint plus importante dans les régions polluées car ces animaux étaient moins chassés et leurs chances de se reproduire augmentaient. Au cours de la désindustrialisation de certaines régions et la diminution de la pollution qui y est associée, la fréquence de la forme carbonaria diminua depuis les années 1960 (figure 37B) (Cook et al., 1986).



**Figure 37 : La phalène du bouleau, un exemple de l'impact environnemental sur la fréquence allélique**

(A) Phénotype « insularia » (clair) et « carbonaria » (sombre) sur une écorce sombre (A) ou sur un bouleau non pollué (A'). Les rectangles bleus indiquent la position du phénotype le moins visible. (B) Changement de la fréquence de la forme « carbonaria » au cours du temps à Caldy et Wirral. La ligne représente une diminution constante de 12% de 1969 à 1986. L'étude montre que la courbe de changement est directement corrélée à la concentration de dioxyde de sulfure présent dans le milieu (Cook et al., 1986).

Cet exemple illustre comment un phénotype morphologique peut modifier la fréquence allélique dans un génome. Cependant, ces modifications de fréquences alléliques peuvent être induites par des variations comportementales. La comparaison des comportements entre les espèces permet de comprendre leurs évolutions. Les paragraphes suivants décrivent des comportements de différentes espèces de poissons.

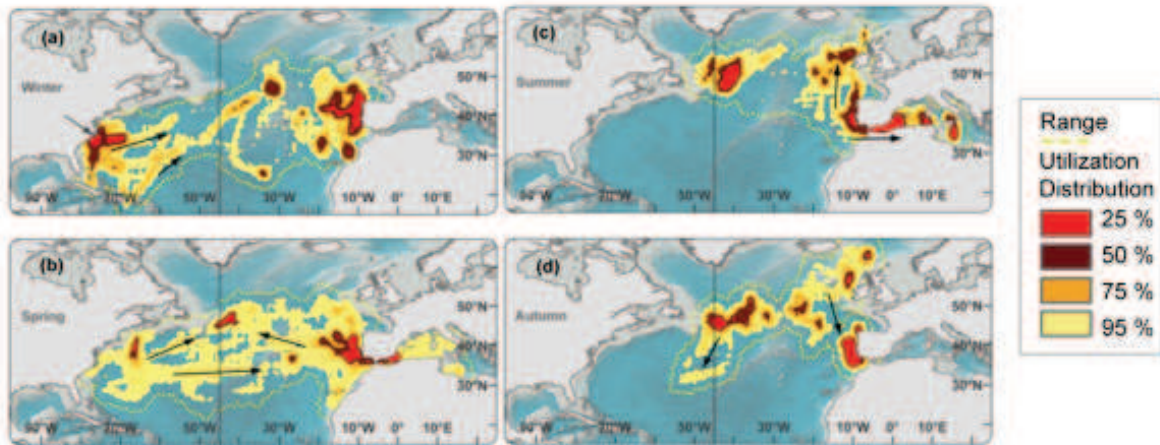
## II.3 Exemples de comportement chez les poissons

### II.3.1 Comportement migratoire

La migration peut être définie comme un mouvement d'aller-retour entre un point initial et une destination, effectué par une population ou un groupe d'individus. La distance parcourue pendant une migration peut être extrêmement variable selon l'espèce, les trajets les plus longs faisant des milliers de kilomètres. La majorité des migrations est cyclique et annuelle, l'animal effectuant plusieurs voyages au cours de sa vie. Pour d'autres espèces, lorsque l'individu ne se reproduit qu'une fois dans sa vie, le cycle de migration s'étend sur l'ensemble de la durée de la vie de l'animal, celui-ci rejoignant son lieu de naissance pour se reproduire et mourir.

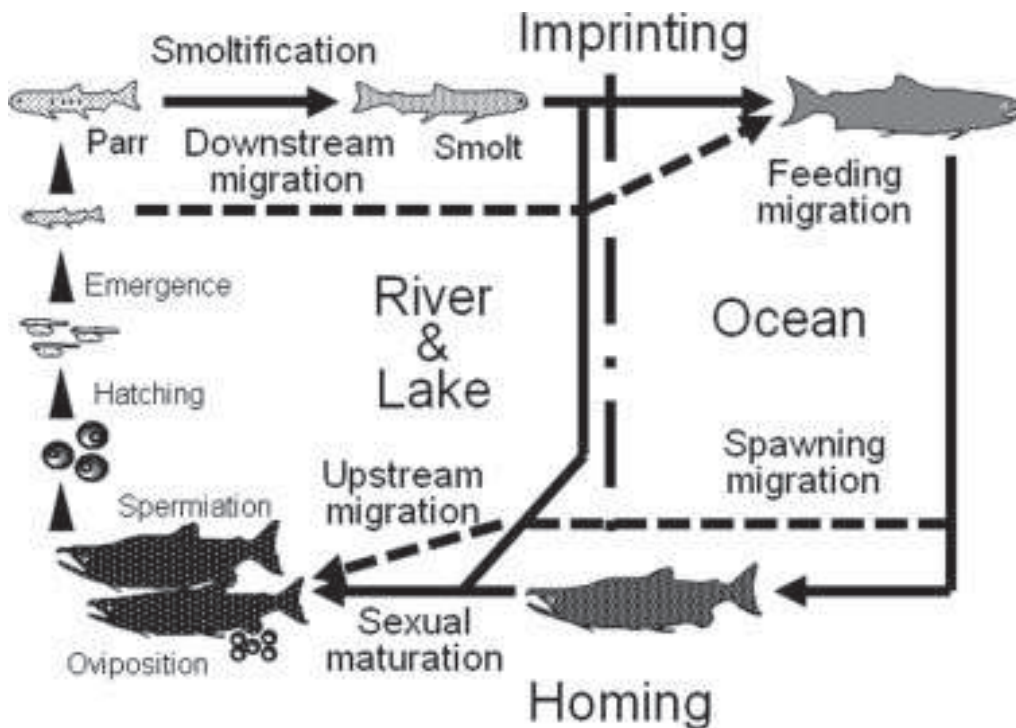
Chez les poissons, il existe plusieurs types de migration :

Lorsque l'espèce réalise l'ensemble de son trajet dans l'environnement marin, on parle de migration thalassique. C'est par exemple le cas du thon de l'Atlantique *Thunnus thynnus*. Grâce au marquage des individus à l'aide de balises électroniques, différentes informations concernant les animaux peuvent être récoltées (luminosité ambiante, température de l'eau et interne, profondeur, géolocalisation...). L'analyse de ces données montre que le déplacement des thons est saisonnier. Quatre régions préférentielles ont été identifiées en fonction de la saison (figure 38). Dans ces zones, les thons s'agrègent et ils nagent à des profondeurs plus faibles. Ces zones semblent correspondre à des lieux où les proies sont nombreuses. Cela



**Figure 38 : Migrations saisonnières des thons dans l'Atlantique**

Le code couleur indique sur les cartes les positions préférentielles des thons (obtenues sur plusieurs années grâce à des implantations de balises GPS) en hiver (a), printemps (b), été (c) et automne (d). Les flèches noires (dans l'océan) indiquent la direction générale des individus pendant la saison. La flèche grise (a) indique l'un des points de regroupement majeur en hiver, au niveau de la Caroline du Nord (Walli et al., 2009).



**Figure 39 : Cycle de vie et migration des saumons**

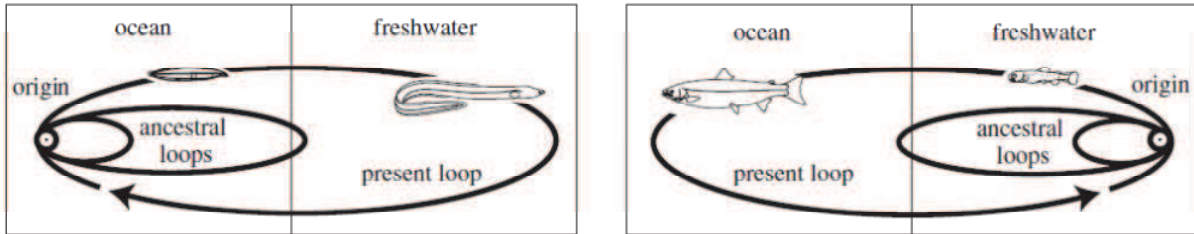
Ce schéma indique les différents stades de développement en eau douce (à gauche) et en eaux salées (à droite). La migration des saumons peut être divisée en plusieurs phases : la migration vers l'aval de l'alevin (downstream migration), la migration vers l'océan pour la phase de croissance (feeding migration), le retour vers les côtes, l'estuaire (spawning migration) et enfin la remontée de sa rivière natale (upstream migration). Les premières étapes du développement et la migration vers l'aval ont des rôles majeurs dans le mécanisme de l'empreinte. Cela permettra à l'adulte, après avoir séjourné plusieurs années dans l'océan, de revenir se reproduire dans le bras de la rivière qui l'a vu naître. (Ueda, 2011)

suggère que les thons se regroupent sur des territoires de chasse qu'ils font évoluer au fur et à mesure de l'année. L'analyse étant réalisée sur plusieurs années, le schéma de migration se répète d'une année sur l'autre. Cette étude montre que la position des thons rouges est prévisible, ce qui risque de poser des problèmes de surpêche pour une espèce déjà menacée d'extinction (Walli et al., 2009).

Lorsque l'espèce réalise l'ensemble de son trajet dans l'eau douce, on parle de migration potamique. C'est le cas, par exemple, de la truite lacustre *Salmo trutta lacustris*. Elle se reproduit dans les rivières d'Europe. Après environ deux ans, les jeunes migrent vers les lacs, comme le lac de Constance (Ruhlé, 1990) ou le lac Léman (Büttiker and Matthey, 1986). Les adultes remontent ensuite leurs rivières natales pour se reproduire. Cette espèce est en forte réduction de nos jours par la multiplication des obstacles artificiels tels que les barrages hydro-électriques. Une stratégie de préservation consiste à pêcher les reproducteurs directement dans les lacs afin de les acheminer dans les rivières.

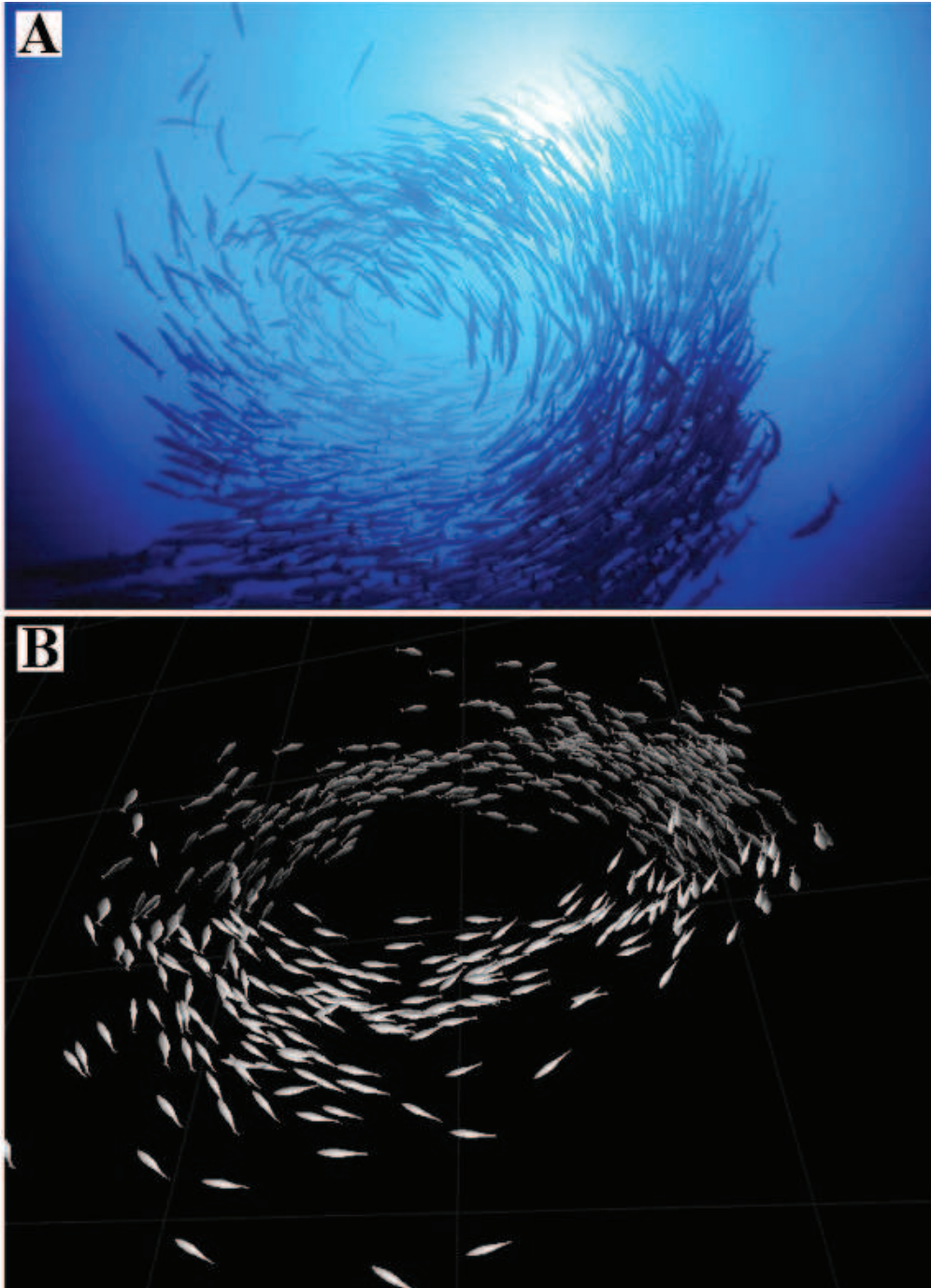
Lorsque l'espèce passe du milieu salé à l'eau douce ou inversement pendant sa migration, on parle de migration amphibiotique. Les poissons se reproduisant en eau douce sont dits « anadromes » alors que ceux qui se reproduisent en mer sont dits « catadromes »

Par exemple, comme le montre la figure 39, le saumon *Salmo salar* est un exemple de poisson anadrome. Les œufs sont pondus très en amont, dans les eaux froides et oxygénées. Après éclosion, les jeunes grandissent et migrent vers l'océan. Le passage de l'eau douce à l'eau salée oblige les poissons à modifier leur métabolisme afin de survivre. Après deux à trois ans en mer, les poissons sont matures sexuellement et remontent leurs rivières natales afin de pondre à l'endroit où ils sont nés (Lohmann et al., 2008). La reconnaissance de la rivière natale s'effectue à l'aide d'une « empreinte olfactive » apprise par l'alevin au moment de l'éclosion (Dittman and Quinn, 1996). Il est probable que cette reconnaissance est faite grâce aux concentrations d'acides aminés libres présentes dans le bras d'eau natal (Ueda, 2011). Par ailleurs, si des œufs sont déplacés et mis dans une autre rivière avant l'éclosion, les saumons reviendront au lieu de leur éclosion et non au lieu de la ponte. A noter que les saumons d'Atlantique peuvent retourner en eau de mer et réaliser ce cycle plusieurs fois dans leur vie alors que les saumons du Pacifique meurent après la ponte.



**Figure 40 : Origine hypothétique des flux migratoires actuels**

Schéma représentant les boucles de migration à partir du milieu de ponte qui ont amené à l'établissement d'un mode de vie amphibiotique. Il représente l'histoire évolutive des anguilles (à gauche) et des saumons (à droite) (Inoue et al., 2010).



**Figure 41 : Formation auto-organisée dans un banc de poissons**

(A) Emergence d'un vortex dans un banc de barracudas : les individus tournent en rond autour d'un noyau vide. (B) Des règles simples utilisées par l'ensemble des individus pour synchroniser leurs mouvements avec leurs voisins peuvent conduire à l'émergence de structures spatio-temporelles à grande échelle.

Source : [www.cognition.ups-tlse.fr/dynactom/dynactomprojets.html](http://www.cognition.ups-tlse.fr/dynactom/dynactomprojets.html)

A l'inverse des saumons, les anguilles européennes *Anguilla anguilla* sont des catadromes. Elles se reproduisent au large de la Floride, en mer des Sargasses (Aarestrup et al., 2009). Quelques semaines après la ponte, les alevins se retrouvent dans les courants du Gulf Stream. Après deux ou trois ans, les jeunes anguilles nommées civelles atteignent les côtes européennes et se rapprochent des estuaires. Elles vivront dans les fleuves et les rivières pendant 8 à 15 ans, le temps d'atteindre la maturité sexuelle. Les adultes retournent ensuite en eau de mer, et migrent vers la mer de Sargasse. Pendant cette migration, les anguilles achèvent leurs processus de maturation sexuelle dans l'eau salée (Righton et al., 2012).

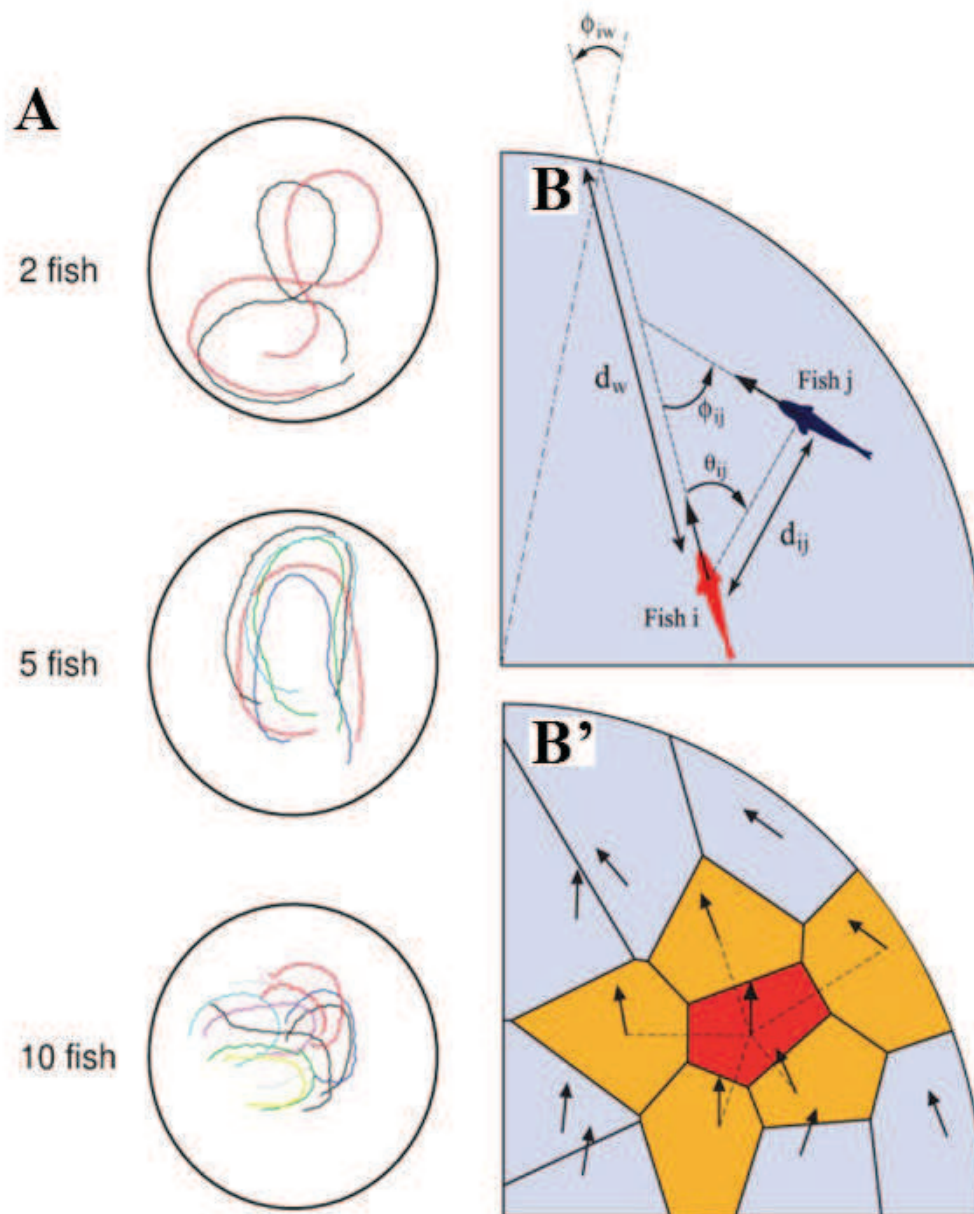
Ce changement de milieu est extrêmement difficile pour toutes les espèces. Les conditions d'osmolarité étant très différentes, les poissons doivent modifier leurs physiologies afin de conserver une bonne balance hydrique et survivre. Il est probable que, au cours de l'évolution, les poissons se sont adaptés pour trouver plus facilement de la nourriture ou échapper au prédateur. Petit à petit, certains poissons auraient changé de milieu. Inoue propose que leurs comportements reproducteurs n'aient pas évolué, certaines espèces restant fidèles à leurs rites nuptiaux et à leurs lieux de ponte ancestraux. Vivant dans un autre milieu, ces dernières doivent migrer pour se reproduire (figure 40) (Inoue et al., 2010).

### **II.3.2 Comportement social**

Chez les poissons, les structures sociales peuvent être de différentes natures. La plus connue est la formation de banc qui est défini comme un regroupement temporaire ou non d'individus plus ou moins nombreux nageant de manière synchronisée (Hoare and Krause, 2003). Cependant, les regroupements de poissons peuvent être plus réduits voir inexistant, dans ce cas les individus vivent en solitaire. Les différentes structures vont être détaillées ci-dessous.

Le terme français « banc » regroupe différentes structures que peuvent adopter les groupes de poissons. Lorsque des individus ont tendance à se rapprocher les uns des autres, on parle de comportement grégaire. Un groupe de poisson vivant à proximité les uns des autres





**Figure 42 : Interactions entre les individus au sein du banc**

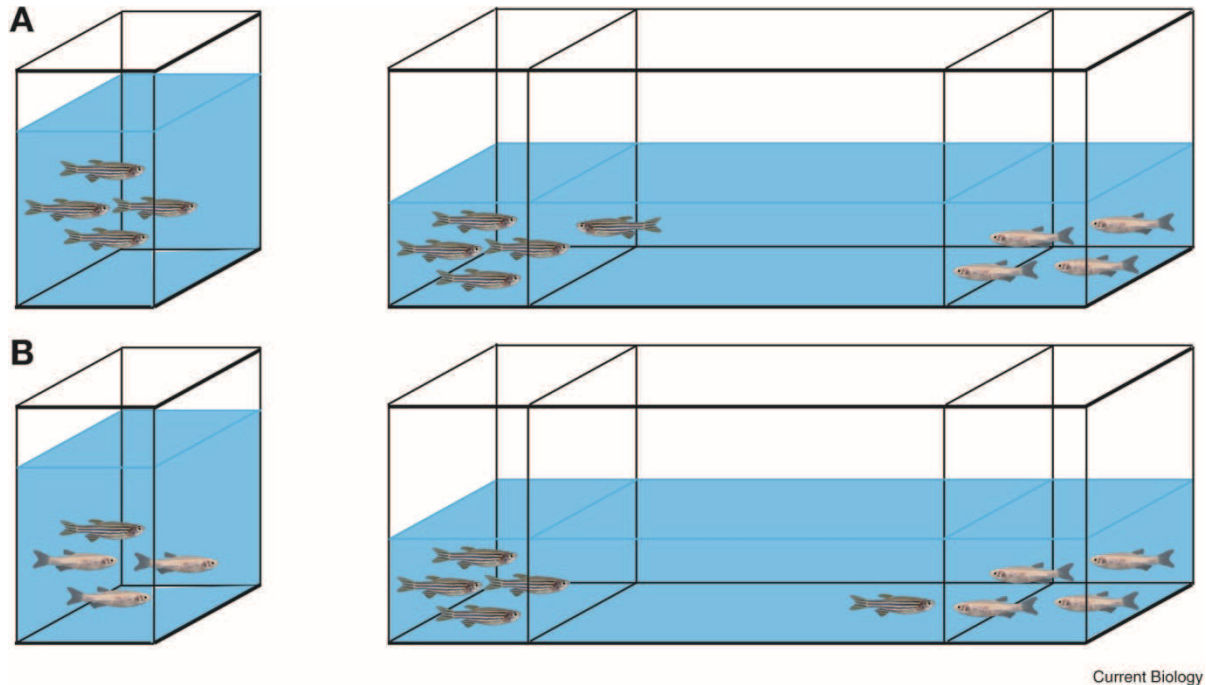
(A) Trajectoires de poissons en fonction de leur densité. Les trajectoires des différents individus sont identiques à faible et moyenne densité, la distance séparant les différentes courbes étant relativement constante. En revanche, à forte densité et dans un espace restreint, la nage en banc n'est plus possible, les trajectoires devenant moins organisées les unes par rapport aux autres. Les trajectoires correspondent à des trajets de 9, 5 et 3 secondes pour les cas respectifs de 2, 5 et 10 poissons. (B) Lorsqu'un obstacle approche (par exemple, une paroi), les poissons adaptent leurs trajectoires et la distance les séparant de leurs voisins varie. Les modèles mathématiques montrent que, pour éviter les collisions, les animaux doivent prendre en compte les directions de leurs voisins (représentées par les flèches noires en B'), les distances les séparant des obstacles et des autres individus ainsi que les différents angles associés (B) (Gautrais et al., 2012).

est considéré comme un banc si leurs mouvements sont synchronisés, c'est-à-dire que le déplacement d'un individu a des conséquences sur les autres. Les bancs peuvent être immobiles (shoaling behavior) (figure 41), les poissons s'organisant autour d'un noyau vide, ou en mouvement (schooling behavior) (Barreiros et al., 2002).

Pour que la formation du banc soit possible, il faut obligatoirement que les animaux s'auto-organisent. De fait, la distance séparant le poisson de ses voisins est relativement constante, permettant ainsi de maintenir la cohésion du groupe. Ce comportement peut être modélisé comme un équilibre de forces d'attraction et répulsion que les différents individus émettent. Par exemple, chez le lieu noir *Pollachius virens*, deux sens sont nécessaires pour qu'un poisson puisse suivre un banc : la vue et la ligne latérale. La privation d'un des deux sens altère cette distance. Un lieu aveugle peut suivre le banc mais se déplacera à une distance plus importante. La vision permet donc « d'attirer » le poisson vers ses congénères. A l'inverse, après la section de la ligne latérale, le poisson se déplacera à une distance plus faible qu'un poisson contrôle. La ligne latérale régit donc des forces de type « répulsion ». A noter qu'un poisson aveugle et sans ligne latérale ne peut nager en banc (Pitcher et al., 1976).

Bien que la distance de nage soit identique entre les poissons, celle-ci peut varier en fonction de l'activité du banc. Par exemple, dans un banc de barracudas *Sphyraena viridensis*, les individus d'un groupe peuvent s'agrèger. Lors des déplacements, les animaux vont se polariser, c'est-à-dire nager dans la même direction. Dans ce cas, les animaux vont se rapprocher les uns des autres (Barreiros et al., 2002).

Pour maintenir la cohésion au sein du banc, un autre facteur est primordial pour l'auto-organisation des individus : la vitesse. En réalité, les animaux se trouvant au centre du banc n'ont aucune visibilité. Ils doivent donc se repérer en fonction de la position des autres individus. C'est encore la distance les séparant de leurs voisins qui est le facteur clé. De fait, lorsque le banc se déplace en ligne droite, tous les individus nagent à la même vitesse. Si le banc change de direction, les animaux modifieront leur vitesse. Par exemple, si le groupe vire vers la droite, les poissons se trouvant à gauche du banc devront accélérer pour rester au niveau de leurs voisins. En contrôlant ces deux facteurs, les animaux s'auto-organisent et maintiennent la cohésion du groupe (figure 42).



**Figure 43 : Apprentissage de la reconnaissance du banc chez le poisson zèbre**

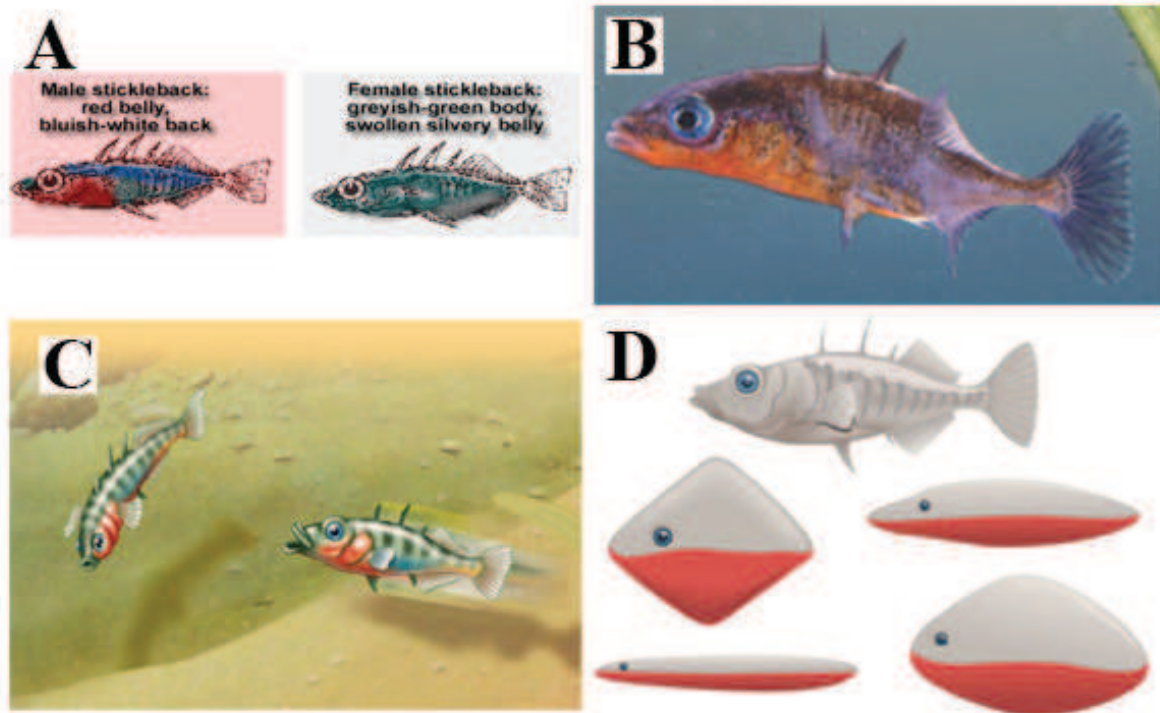
Cette expérience montre que le poisson zèbre sauvage ayant grandi avec d'autres poissons zèbres de même phénotype préfère se rapprocher de congénères sauvages plutôt que de poissons zèbres mutants « nacrés » (A). En revanche, un poisson zèbre sauvage ayant grandi dans un banc de *Danio* nacrés choisit de se rapprocher de ce banc plutôt que de poissons zèbres sauvages (B). Ces deux expériences montrent que les individus apprennent à reconnaître le phénotype des individus du banc et recherchent des individus similaires lors du choix d'un banc (Peichel, 2004).

Selon les espèces étudiées, le comportement grégaire peut être présent dans l'ensemble de la vie d'un individu ou celui-ci peut être simplement temporaire. Les raisons de la formation d'un banc peuvent être multiples : agrégation pour les phases de repos, rapprochement pour la reproduction, avantage anti-prédateur ou encore pour la recherche de nourriture (Barreiros et al., 2002; Peichel, 2004).

Les différents bancs de poissons peuvent interagir les uns avec les autres. Si les individus font partie de la même espèce ou s'ils appartiennent à une même niche écologique, des individus peuvent changer de groupe. Des études ont montré que les poissons zèbres sont capables de « reconnaître » les bancs. Ainsi, comme le montre la figure 43, lorsque les poissons ont le choix entre deux groupes, ils ont tendance à préférer un groupe qui est similaire à celui dans lequel ils ont grandi (Peichel, 2004).

Chez certaines espèces, il n'y a pas de système de dominance visible au sein du banc. Chaque poisson est donc « l'égal » de l'autre et aucun poisson n'a de position définie. A l'inverse, certaines espèces ont adopté des organisations hiérarchiques. Par exemple, chez le barracuda, une ségrégation sexuelle se retrouve au sein du banc. De fait, les femelles ont tendance à être plus grosses que les mâles et elles se positionnent préférentiellement dans la partie inférieure du banc. C'est un emplacement stratégique puisqu'elles sont relativement protégées de la majorité des attaques des prédateurs tout en ayant accès à une quantité importante de proies lors des périodes de chasse (Barreiros et al., 2002). Chez les guppys *Poecilia reticulata*, l'organisation est différente et les femelles se situent au cœur du banc. Les mâles se retrouvent en périphérie, s'exposant plus à la prédation mais ils augmentent ainsi leurs chances de se reproduire (Griffiths and Magurran, 1998).

Bien que les comportements de dominance puissent se retrouver au sein d'un banc, les poissons ayant une agressivité forte envers leurs congénères privilégient généralement des comportements plus territoriaux qui peuvent conduire les animaux à une vie solitaire. Dans ce cas, une zone de taille variable devient plus ou moins exclusivement défendue par un individu ou un groupe. Ces zones peuvent varier en fonction de la saison, la densité de la population ou des interactions entre les individus. L'intérêt est alors de protéger un territoire afin de chasser mais aussi pour attirer les femelles et pour protéger leur progéniture. Ce territoire peut être



**Figure 44 : Comportement social de l'épinoche**

(A) Dimorphisme sexuel de l'épinoche *Gasterosteus aculeatus*. (B) Photo d'un mâle épinoche. La partie ventrale de l'animal est rouge. (C) Comportement agressif de l'épinoche. Lorsqu'un mâle pénètre sur le territoire d'un autre mâle, celui-ci chasse l'intrus en l'agressant. (D) Expérience de l'agressivité de l'épinoche vis-à-vis de différents leurres présentés ici. Le modèle réaliste (en haut) sans couleur rouge au niveau ventral ne produit pas de réponse agressive chez le mâle épinoche. En revanche, l'ensemble des autres leurres, avec la partie ventrale colorée en rouge, produit une forte réponse agressive chez le mâle (malgré les formes grossières). Cette expérience suggère que l'épinoche reconnaît les concurrents éventuels par leur coloration rouge (Campbell and Reece, 2004).

gardé farouchement. Par exemple, chez le poisson combattant *Betta splendens*, les mâles se livrent des combats à mort pour conserver leur territoire. Chaque nid étant séparé d'environ un mètre, les guerres de territoire sont fréquentes (Jaroensutasinee and Jaroensutansinee, 2001; Jaroensutasinee and Jaroensutasinee, 2003).

Un exemple de poisson solitaire est le brochet *Esox lucius*. Son comportement consiste en une défense agressive d'une zone précise. De fait, tout intrus pénétrant dans son territoire est considéré comme une proie et ce dernier sera attaqué instantanément. La seule exception se fait pendant une courte période de reproduction. Les mâles et les femelles adoptent alors un comportement sociable le temps de s'accoupler avant de reprendre rapidement leurs comportements habituels.

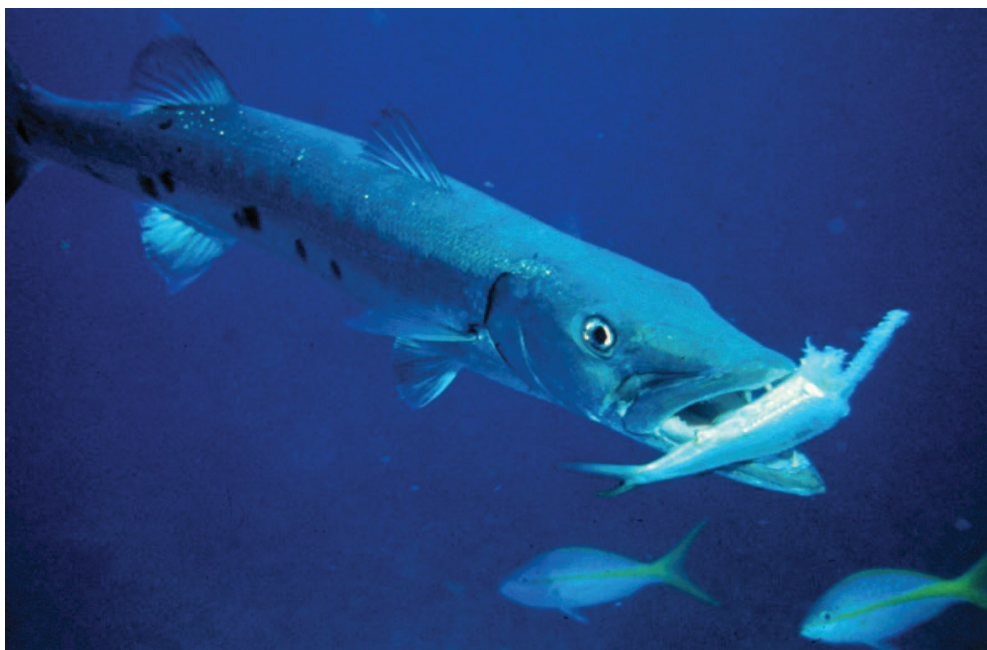
L'épinoche *Gasterosteus aculeatus* est un autre poisson territorial. Contrairement au brochet, seuls les mâles sont territoriaux. Il existe un dimorphisme sexuel important entre les mâles et les femelles (figure 44A). Les épinoches mâles ont le ventre rouge (figure 44B). Pour protéger son territoire de concurrents potentiels, l'épinoche agresse les autres mâles pénétrant dans sa zone (figure 44C). Pour cela, il attaque tout objet qui possède une partie ventrale rouge. Lorsque l'ensemble des leurres présentés dans la figure 44D sont testés, tous les leurres colorés sont attaqués. Au contraire, le leurre ressemblant à une épinoche et sans couleur n'est pas reconnu comme un concurrent et n'est pas chargé.

Le plus souvent, les espèces appartenant à la famille des cichlidés sont territoriales. Ici, c'est généralement un couple qui va protéger son territoire. Ces poissons sont célèbres pour leur comportement reproducteur et pour le soin que les parents apportent à leurs progénitures. Ce comportement sera détaillé plus loin. Cependant, il est intéressant de noter que les individus gardent le territoire farouchement si la femelle a pondu des œufs ou si des jeunes larves se développent. Les parents changent leurs patterns de coloration en fonction de ce cycle afin de « prévenir » les individus aux alentours que le territoire est farouchement gardé (Fernald, 2003). Par exemple, la figure 45 présente la coloration de mâles *Haplochromis burtoni* en période de reproduction (en bas) ou non (en haut).



**Figure 45 : Phase de reproduction et coloration des cichlidés mâles *Haplochromis burtoni***

Les *Haplochromis burtoni* mâles modifient leur coloration en fonction de la phase de reproduction. Lorsqu'un mâle n'est pas en phase de reproduction et qu'il ne défend pas son territoire, il présente des couleurs neutres lui permettant de se camoufler (en haut). Lors de la protection d'un territoire, le cichlidé devient très coloré (jaune ou bleu) avec des spots orangés et sombres au niveau des nageoires (Fernald, 2003).



**Figure 46 : le barracuda *Sphyraena barracuda* en période de chasse**  
Source : <http://www.dinosoria.com/barracuda.htm>

### II.3.3 Comportement alimentaire

Les poissons peuvent avoir différents régimes alimentaires. Certains filtrent l'eau et se nourrissent de plancton (cas du cichlidés du Nil *Oreochromis niloticus*), d'autres sont herbivores ou détritivores (comme le *Ancistrus Dolichopterus* ou le mullet *Agonostomus monticola*) et d'autres sont des carnassiers chassant des proies vivantes.

Quatre schémas de chasse peuvent être observés chez les carnassiers (comme le barracuda *Sphyraena barracuda* présentés sur la figure 46) (Barreiros et al., 2002) :

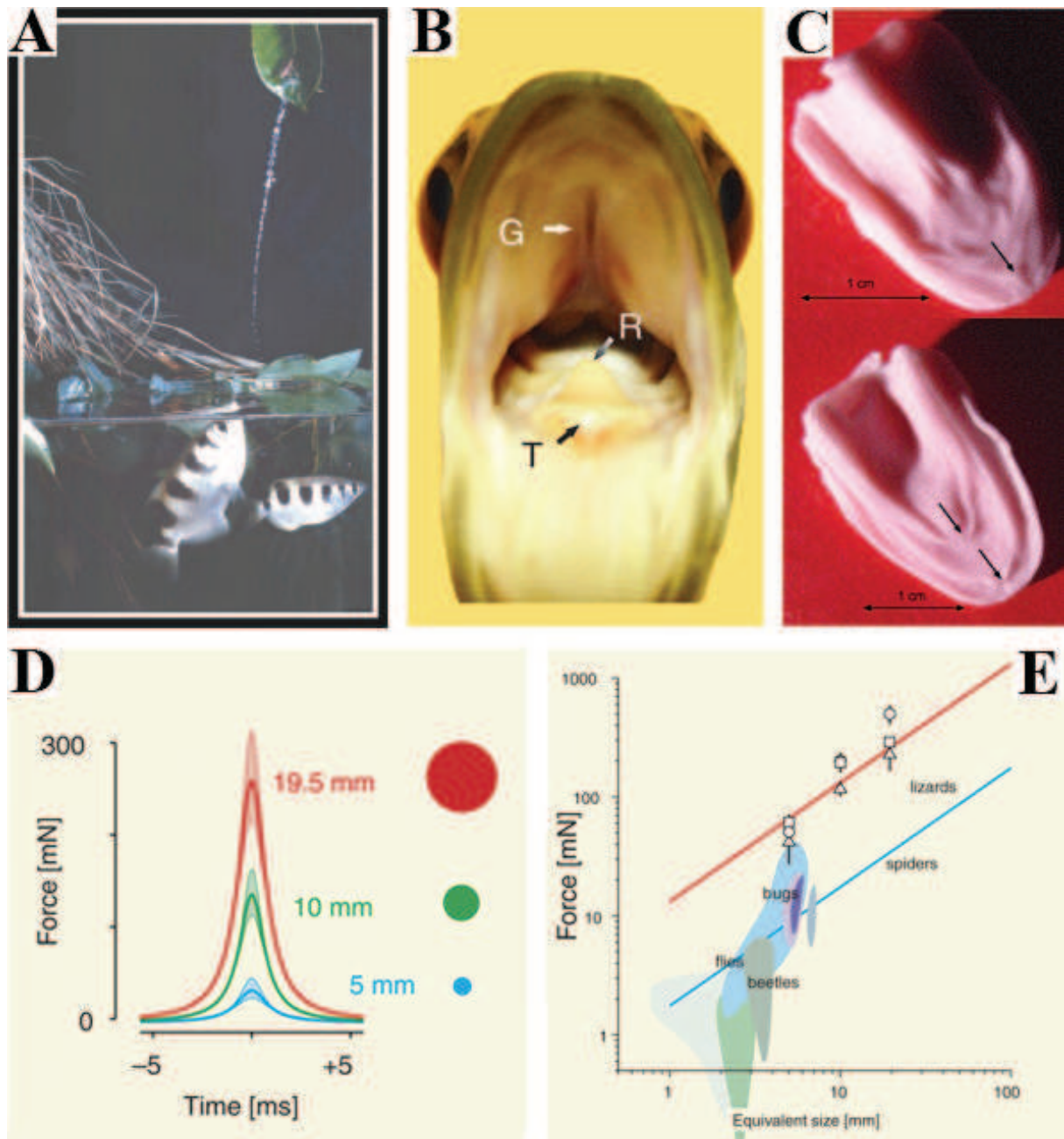
Dans le premier cas, un prédateur va attaquer une proie. Le carnassier, après s'être approché le plus près possible, attaque subitement et rapidement. Pour le barracuda, environ 30% des tentatives sont fructueuses.

Dans le deuxième cas, plusieurs prédateurs vont chasser une proie unique. Plusieurs animaux pourchassent la proie. Pour le barracuda, le taux de réussite est quasiment de 100% avec cette stratégie et la proie est capturée après une chasse de 6 à 50 secondes.

Dans le troisième cas, un prédateur s'attaque à plusieurs proies. Ici, le prédateur doit choisir sa proie. Généralement, le prédateur doit réaliser plusieurs attaques pour réussir car les mouvements des autres individus le perturbent. Le groupe de proies se disperse à chaque tentative. Le taux de succès est d'environ 75% pour les barracudas.

Dans le quatrième cas, plusieurs prédateurs vont s'attaquer à un banc. Chez quelques espèces, le groupe de prédateurs n'attaque pas selon le même angle mais élabore parfois des stratégies pour guider la proie vers un « piège ». Si les proies sont près de la surface de l'eau, les prédateurs attaquent d'abord par-dessous et dans un second temps par les cotés (68% de réussite). Si les proies sont entre deux eaux, les prédateurs attaquent directement la partie basse du banc (72% de réussite). Enfin, si les proies sont situées dans le fond, les prédateurs attaquent latéralement (89% de réussite).





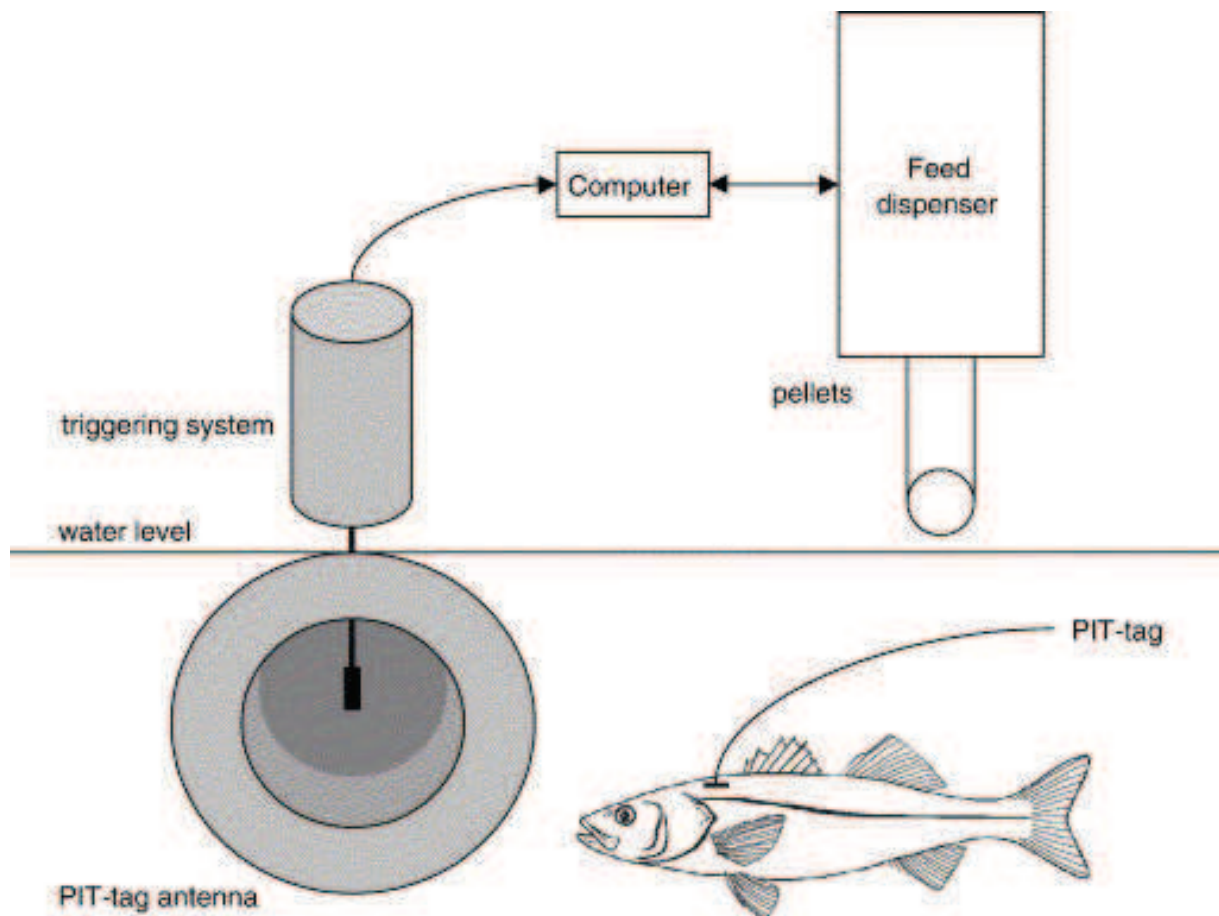
**Figure 47 : Le poisson archer *Toxotes jaculatrix* : une technique de chasse atypique**

(A) Un poisson archer fait tomber une proie à l'aide d'un jet d'eau (Mokeichev et al., 2010). Pour le former, le poisson utilise une sorte de « sarbacane ». (B) Ce tube est formé par une cavité partant de la gorge (G) et présente sur toute la longueur du palais (R). Lorsque la bouche est fermée, la langue (T) forme le bas tube (Schlegel et al., 2006). (C) Moulage de la cavité buccale dorsale (en haut) et ventrale (en bas). Les flèches noires indiquent la cavité (au niveau dorsal) et la position de la langue (dans le moulage ventral) (Timmermans and Souren, 2004). (D) La puissance du jet est directement corrélée à la taille de la proie (les courbes de couleurs correspondent à la taille de la proie, représentée par la taille des points et les valeurs associées) et le temps de transfert de la force du jet vers la cible est très court. (E) La droite bleue correspond à la force maximale d'adhésion des proies potentielles en fonction de leurs natures (représentées par les différentes aires colorées) et de leurs tailles. La droite rouge correspond à la force maximum transférée par le jet d'eau. Le poisson archer utilise donc une force dix fois plus importante que nécessaire pour déloger sa cible (Schlegel et al., 2006).

De nombreuses espèces chassent en banc. Le nombre d'individus peut être important. Cette méthode présente deux avantages majeurs. Non seulement le taux de succès est augmenté mais en plus la vie en banc les protège des super-prédateurs. Par contre, si la quantité de nourriture est limitée, la probabilité de capturer une proie est réduite à cause de la concurrence.

D'autres espèces de poissons ont adopté des méthodes de chasse particulièrement complexes. Les poissons archers *Toxotes jaculatrix* sont des poissons asiatiques d'eau douce vivant dans les mangroves et ayant subi des adaptations morphologiques et comportementales. Leur nom vient de leur technique de chasse. Comme le montre la figure 47A, lorsqu'une proie (mouche, araignée, lézard) se trouve sur une branche au dessus de l'eau, ces poissons projettent un jet d'eau pour les faire tomber et les dévorer (Mokeichev et al., 2010; Schlegel et al., 2006; Schuster, 2007; Timmermans and Souren, 2004). Morphologiquement, ils possèdent une cavité au niveau du palais (figure 47B et C). En plaçant la langue contre le palais, ils forment un tube leur permettant d'ajuster l'angle de projection (Timmermans and Souren, 2004). Le jet d'eau est déclenché par un claquement des ouïes.

D'un point de vue comportemental, l'étude de ce poisson est très intéressante car il est capable de faire tomber une proie se trouvant jusqu'à un mètre au dessus de l'eau. Pour avoir une telle précision, il doit prendre en compte la gravité (alors qu'il n'y est pas soumis) mais aussi la réfraction de la lumière au niveau de la surface de l'eau (les yeux du poisson restant dans l'eau lors du tir). Par ailleurs, le poisson archer adapte la puissance du jet en fonction de la nature de la proie et de sa taille (figure 47C). De fait, le jet d'eau transfère à la cible une force dix fois supérieure à celle nécessaire pour la déloger (figure 47E) (Schlegel et al., 2006). Un autre comportement marquant est qu'en plus de viser avec précision sa proie, le poisson archer estime la position où elle tombera dans l'eau. En effet, ces animaux vivant en groupe, le « tireur » doit anticiper le lieu de chute pour capturer immédiatement la proie avant qu'un autre poisson ne la prenne (Schuster, 2007). Cette espèce est donc un modèle idéal pour étudier les réseaux neuronaux impliqués dans la modélisation spatiale.



**Figure 48 : Le système du « self-feeder »**

Lorsque le poisson (ici, un bar) portant une puce électronique (PIT-tag) s'approche de l'antenne, l'ordinateur enregistre différentes informations (heure, identité de l'animal) et actionne un distributeur de nourriture qui laissera tomber quelques granulés (pellets) dans le bassin (Covès et al., 2006).

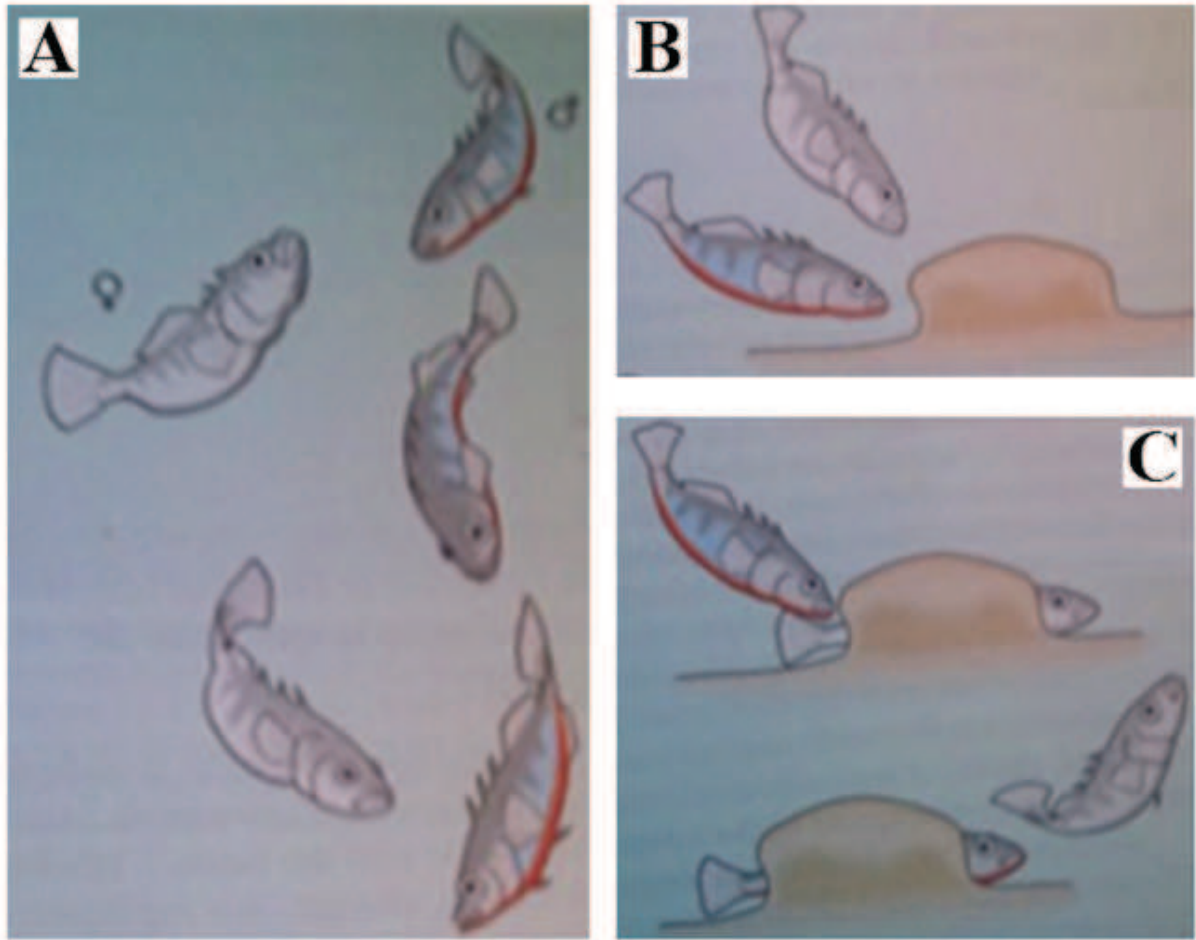
Comprendre le comportement alimentaire des poissons est un enjeu à la fois scientifique et économique car, pour les fermes aquacoles, l'alimentation des animaux est d'une importance capitale. De fait, si les animaux sont sous-nourris, ils auront des carences et des problèmes de développement, ce qui induira des pertes économiques. A l'inverse, si les animaux sont trop nourris, l'excès de nourriture non consommée induit un coût et pollue l'eau, entraînant des problèmes environnementaux et une augmentation des risques sanitaires. Par conséquent, le bon dosage du nourrissage est primordial. De nombreux projets tentent de trouver le bon compromis. Pour cela, différentes méthodes ont été développées comme le « self-feeder ».

Le « self-feeder » est un système permettant l'auto-nourrissage des poissons. Comme le montre la figure 48, lorsqu'un animal portant une puce électronique passe à proximité d'un détecteur, un ordinateur enregistre l'heure et l'individu détecté puis déclenche la libération d'une petite quantité de nourriture. Ce comportement fonctionne selon le principe du conditionnement opérant présenté dans la partie II.1.2.8.

En aquaculture, le « self-feeder » est utilisé sur de nombreuses espèces comme la truite *Oncorhynchus mykiss* (Alanärä, 1992), le bar *Dicentrarchus labrax* (Benhaïm et al., 2011; Covès et al., 2006; Di-Poï et al., 2007; Di-Poi et al., 2008) ou l'omble chevalier *Salvelinus alpinus* (Alanärä et al., 1998) afin de mieux comprendre les besoins alimentaires des animaux en fonction de leurs rythmes circadiens.

Ce système permet de connaître les préférences et les habitudes alimentaires en fonction de la journée et des saisons. Lorsque ce mécanisme est utilisé dans un bassin contenant un banc de poisson, il permet également de mieux comprendre l'organisation sociale existant dans le groupe.

Par exemple, Covès et Al ont montré que dans un groupe de 50 bars, seul un ou deux individus sont responsables de 80% des demandes de nourriture. Les autres n'actionnent que rarement le mécanisme et certains individus ne le font jamais (Covès et al., 2006). De fait, chez l'omble chevalier, il existe un lien fort entre la demande de nourriture et le comportement hiérarchique. En analysant le statut social et l'activité sérotoninergique des



**Figure 49 : Parade nuptiale de l'épinoche à trois épines**

(A) Lorsqu'une femelle pénètre sur le territoire d'un mâle, celui-ci fait une démonstration de nage. Il tourne autour de la femelle et descend en spirale vers un nid qu'il a préalablement construit. Si la femelle est intéressée et si le mâle réalise une démonstration parfaite, elle le suivra. (B) Le mâle indique l'entrée du nid à la femelle. (C) Celle-ci pénètre dans le nid et pond des œufs (le mâle lui piquant la queue pour la stimuler). (D) Lorsque la femelle s'en va, le mâle pénètre dans le nid et féconde les œufs (Campbell and Reece, 2004).

ombles chevaliers, Alanärä montra que les poissons « demandeurs » sont les dominants du groupe (Alanärä et al., 1998). Les poissons du banc sont alors désignés dominants, subordonnés et dominés en fonction de l'activation ou non du self-feeder.

### II.3.4 Comportement sexuel

Les poissons peuvent avoir différentes stratégies pour se reproduire. Chez certaines espèces, un couple se forme après la réalisation de la parade nuptiale. Pour d'autres, les individus se regroupent et les mâles et les femelles libèreront simultanément leurs semences dans l'environnement. C'est le cas, par exemple, des saumons et des anguilles (décrit dans la partie II.3.1).

La parade nuptiale est spécifique à chaque espèce. Généralement, les mâles vont être en concurrence les uns avec les autres et les femelles choisissent leurs partenaires. Dans la majeure partie des cas, le choix des femelles se porte sur des mâles ayant des caractéristiques fortes (coloration prononcée, position sociale dominante dans un groupe, ...) Pour attirer les faveurs d'une femelle, les mâles réalisent des parades parfois complexe afin de montrer leurs capacités physiques ou cognitives aux femelles.

Par exemple, la figure 49 illustre la parade typique de l'épinoche. De fait, en période de reproduction, le mâle construit un nid dans le sable. Lorsqu'une femelle pénètre sur son territoire, le mâle s'approche de la femelle. Si celle-ci est intéressée, elle va prendre une posture dite de soumission. Il va donc se rapprocher du nid en réalisant la parade (une sorte de nage en zig-zag) et indique l'entrée du nid à la femelle. La parade est réussie si la femelle entre dans le nid pour pondre ses œufs. Une fois la femelle partie, le mâle y pénètre à son tour pour féconder les œufs.

Pour certaines espèces, séduire une femelle n'est pas chose facile. Dans certains cas, les mâles subordonnés développent des stratégies afin de duper les femelles et pouvoir se reproduire.



**Figure 50 : Adaptation morphologique des tétras porte-épées mâles *Corynopoma riisei* pour le comportement reproducteur**

Le mâle (à droite) possède un ornement au niveau de l'opercule. Celui-ci peut prendre des colorations différentes afin de se rapprocher de la nourriture habituelle. En tentant de l'attraper, la femelle (à gauche) se place automatiquement à une position où le mâle peut la féconder (Kolm et al., 2012).

Par exemple, chez le xypho mexicain *Poecilia mexicana*, les femelles ont tendance à choisir les mâles qui se sont déjà accouplés avec d'autres femelles. On parle de choix par mimétisme (ou « mate choice copying »). Les mâles ne présentant pas d'attrait particulier ont développé une stratégie pour arriver à séduire les femelles. De fait, les mâles en question développent un comportement homosexuel, les mâles s'exhibant entre eux et mimant des accouplements. Les femelles aux alentours les observent puis sélectionnent les mâles en question (Bierbach et al., 2013).

Un autre exemple est celui du guppy *Poecilia reticulata*. Ici, le choix des femelles se fait principalement sur la coloration des mâles. La stratégie du mâle célibataire est de s'entourer d'autres mâles dont les couleurs sont « fades ». Ainsi, le mâle en question devient l'individu le plus « beau » du groupe et il augmente ses chances d'être choisi. Gasparini testa ce comportement dans une expérience ingénieuse. Un mâle guppy doit choisir entre deux femelles placées à chaque extrémité d'un aquarium. La première est entourée d'un harem de « beaux » mâles tandis que la deuxième a un harem de mâles aux teintes ternes. Le mâle testé choisit préférentiellement de courtiser la deuxième femelle (Gasparini et al., 2013).

Enfin, chez certaines espèces, les mâles ont subi des modifications morphologiques pour approcher les femelles. C'est le cas d'un characidés, le tétra porte-épée *Corynopoma riisei*. Comme le montre la figure 50, le mâle possède un ornement au niveau de la nageoire. Ce dernier peut modifier légèrement la forme et la couleur afin de mimer la nourriture majoritaire présente dans le milieu. De fait, lorsque la femelle tente de manger l'ornement, le mâle le ramène contre lui pour le conserver. Par contre, en dupant la femelle, le mâle oblige la femelle à s'approcher et à se situer à une position idéale pour être stimulée et recevoir le sperme (Kolm et al., 2012). A noter que dans certains cas, la femelle peut attraper et arracher l'ornement du mâle. Dans ce cas, celui-ci repousse au bout de quelques semaines (Mirjam Amcoff, communication personnelle).

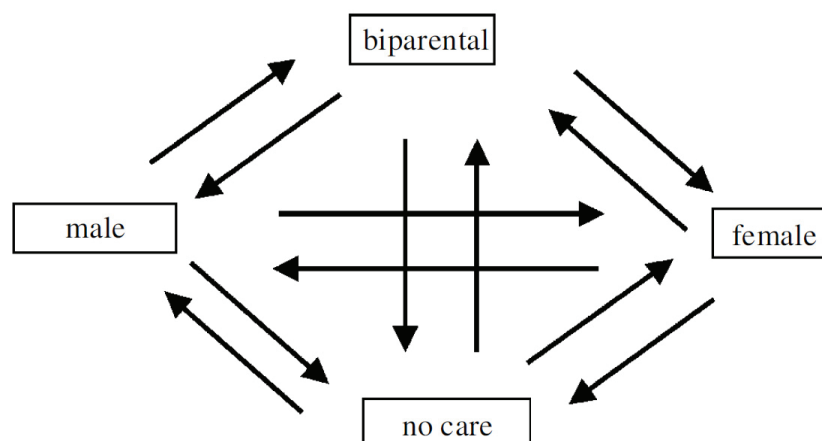
Les comportements nuptiaux sont extrêmement importants pour l'évolution. C'est eux qui permettent à des individus d'une même espèce de se reconnaître et de se reproduire. Dans certains cas, la frontière entre deux espèces peut être comportementale, c'est-à-dire que les





**Figure 51 : Variation de la coloration des mâles *Pundamilia pundamilia* et *Pundamilia nyererei***

Les cichlidés *Pundamilia pundamilia* (en bleu) et *Pundamilia nyererei* (en rouge) sont des espèces différentes. Cette divergence est probablement due à la variation de la couleur des mâles qui est importante lors de la sélection sexuelle. Les mâles et les femelles des deux espèces n'arrivent donc pas à interagir, provoquant une barrière entre eux. Les deux espèces ont divergé très récemment (Maan and Seehausen, 2011).



**Figure 52 : Catégories de soins parentaux existant chez les poissons**

Les flèches noires représentent les transitions potentielles des soins parentaux, allant de l'absence de soin à la protection réalisée par les deux parents (Reynolds et al., 2002).

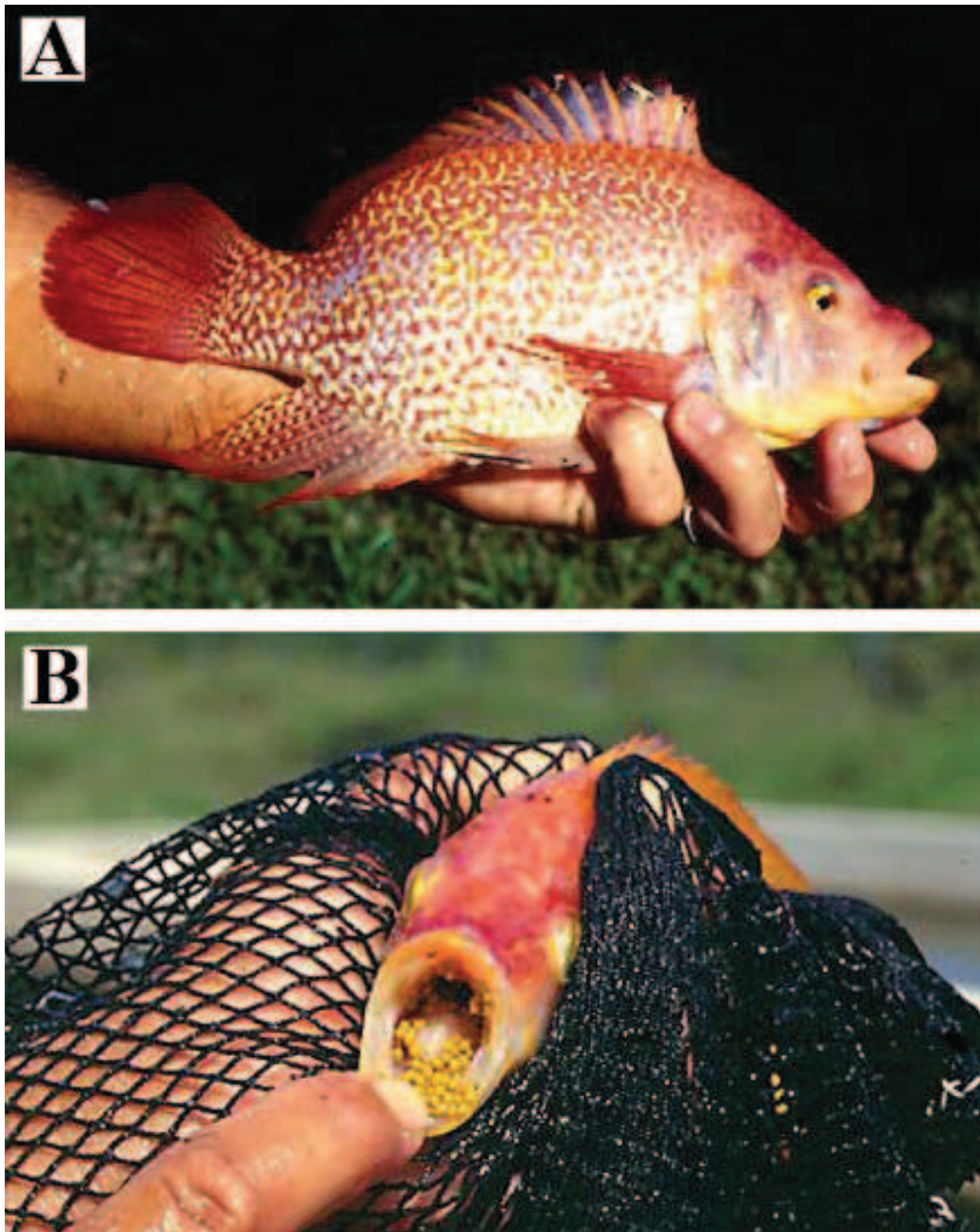
individus de deux populations sont capables de donner une descendance viable et fertile, mais une fécondation *in vitro* est nécessaire pour les croiser. De fait, les animaux sont génétiquement compatibles mais les mâles et les femelles ne se reconnaissent plus car leurs parades nuptiales ont divergé et ils ne peuvent plus se reproduire naturellement.

Par exemple, les espèces de cichlidés *Pundamilia pundamilia* et *Pundamilia nyereirei* sont deux espèces dont les parades divergent. De fait, la coloration nuptiale des mâles est bleue (*P. pundamilia*) ou rouge (*P. nyereirei*) (figure 51). Alors que la localisation géographique est similaire (les îles du Lac africain Victoria), *P. pundamilia* a tendance à vivre entre deux eaux, dans un environnement lumineux alors que *P. nyereirei* vit dans les eaux plus profondes et plus sombres. Le choix des femelles se fait toujours en fonction de la coloration du mâle mais leurs préférences ont évolué avec le milieu (Castillo Cajas et al., 2012; Maan et al., 2004). De plus, le système visuel des deux espèces est différent, provoquant des atténuations de la détection du pattern nuptial de l'autre espèce. Maan suggère que ces deux critères peuvent être à l'origine de la spéciation des *Pundamilia* (Maan and Seehausen, 2011).

La majorité des espèces de téléostéens sont des ovipares. Cependant, certaines espèces comme le guppy *Poecilia reticulata* ou les xyphos *Xyphophorus hellerii* sont des ovovivipares, c'est-à-dire que la fécondation des œufs se fait à l'intérieur de la femelle qui conservera les œufs le temps que ceux-ci se développent. Ainsi, lors de la « ponte », des larves nageantes sont libérées. L'intérêt de cette stratégie est d'augmenter les chances de survie par rapport à une ponte classique. Cependant, cela signifie que la quantité d'œufs fécondés est beaucoup plus faible également.

D'autres stratégies sont mises au point pour protéger les œufs et augmenter le taux de survie de la descendance. La famille des cichlidés est connue dans le monde de l'aquariophilie pour les soins parentaux.

Comme le montre la figure 52, on peut catégoriser les différentes espèces en fonction des soins apportés : « pas de soin », « soins monoparentaux paternels », « soins monoparentaux maternels » et « soins biparentaux ». Dans la grande majorité des cas, les



**Figure 53 : Soins parentaux des tilapias à gueule rouge : l'incubation buccale**

Ces cichlidés sont un exemple d'incubation buccale, c'est-à-dire que le poisson place ces œufs dans sa bouche pour les protéger de la prédation. Cette incubation oblige l'animale à jeuner et peut durer plusieurs semaines.

Source : [www.svt.ac-reunion.fr/](http://www.svt.ac-reunion.fr/)

soins sont apportés par la femelle. Une seule espèce de cichlidé est connue pour donner des soins exclusivement paternel : *Sarotherodon melanotheron* (Reynolds et al., 2002).

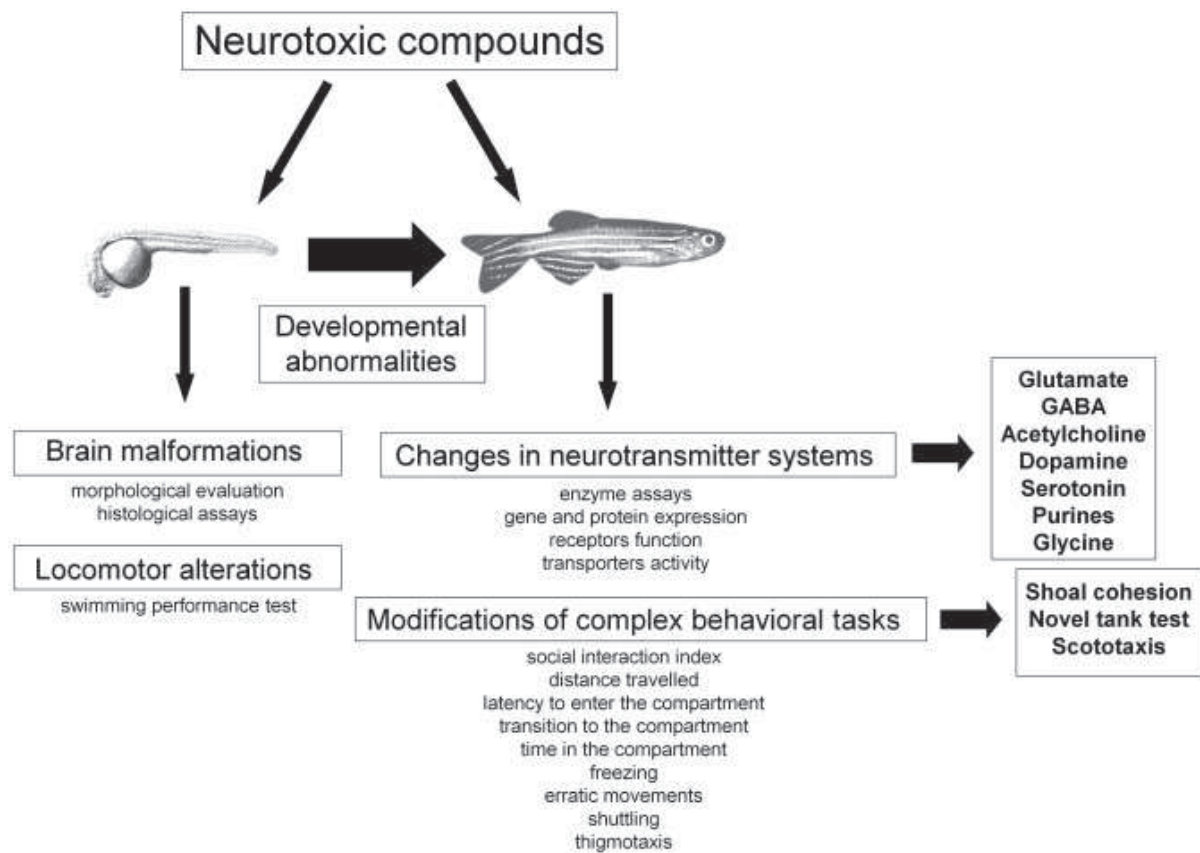
Chez certaines espèces, le couple protège les petits. Généralement, les parents adoptent une coloration particulière et protègent farouchement le territoire contre tout intrus pendant plusieurs jours voire plusieurs semaines après la ponte.

L'incubation buccale est l'un des moyens de protection les plus optimisés. De nombreuses espèces réalisent ce comportement, comme par exemple le tilapia à gueule rouge (figure 53). Leurs œufs sont pondus dans une cuvette creusée dans le sable. Après fécondation des œufs par le mâle, la femelle prend les œufs dans sa bouche. Ceux-ci pourront se développer sans risque de prédation. Par contre, la femelle ne peut plus s'alimenter pendant tout le temps de l'incubation. Celle-ci varie en fonction des espèces, mais elle dure en moyenne trois semaines.

### **II.3.5 Intérêts sanitaires et pharmaceutiques de l'étude du comportement**

A l'heure actuelle, de nombreux laboratoires utilisent des modèles poissons, en particulier le poisson zèbre, pour comprendre les mécanismes physiologiques et les différents dysfonctionnements neuronaux impliqués dans l'induction de troubles neurologiques. En effet, bien que des différences morphologiques existent, de nombreuses régions cérébrales des mammifères ont des régions homologues clairement définies chez le poisson (cf. la partie I.3.1). De plus, les poissons sont sensibles à l'exposition aux polluants ou à des traitements pharmacologiques. L'analyse des modifications du développement ou des paramètres physiologiques est rapide. Les études ont montré que les résultats obtenus chez le poisson sont généralement comparables à ceux obtenus chez les mammifères dans les mêmes conditions.

Par exemple, le poisson zèbre est devenu un excellent modèle vertébré pour étudier la biologie du développement et la fonction des gènes. En mutant spécifiquement les gènes homologues des gènes humains connus pour être impliqués dans des pathologies, des lignées



**Figure 54 : Conséquences morphologiques, développementales et comportementales d'une exposition à des composés neurotoxiques**

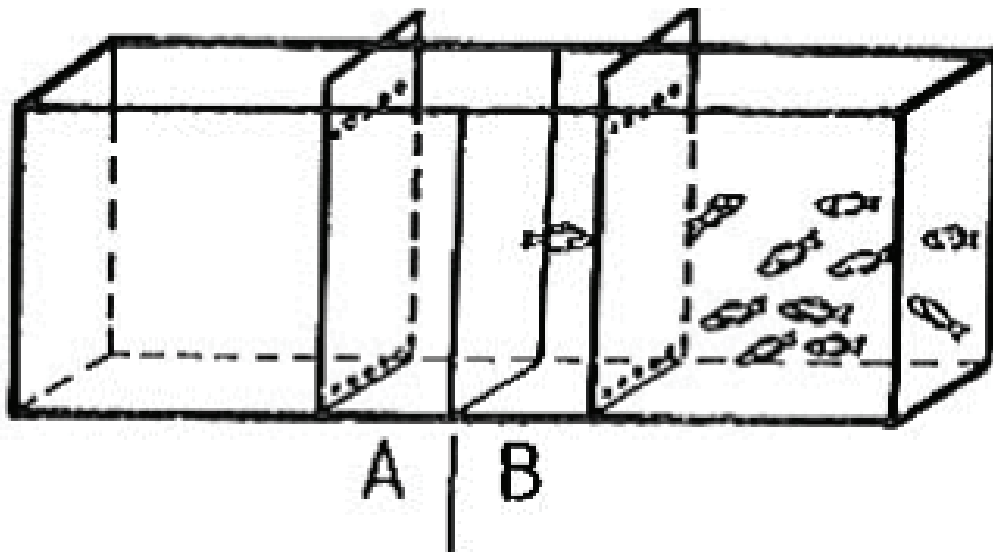
Le poisson zèbre est un excellent modèle pour évaluer au niveau cellulaire, morphologique, physiologique et comportemental les effets des composés sur des alevins ou des adultes. De même, l'action de molécules ayant des effets neuroprotecteurs potentiels peuvent être analysée grâce à ce modèle (Rico et al., 2011).

transgéniques mimant les maladies humaines ont été réalisées. Ainsi, il existe désormais des lignées de poissons zèbres pour l'étude des maladies de Parkinson, de Huntington ou encore d'Alzheimer. Par conséquent, ces poissons se révèlent être un outil précieux pour effectuer des criblages de molécules et pour réaliser à grande échelle des dosages précliniques de nouveaux médicaments (Xi et al., 2011). Une fois les tests réalisés et les résultats concluants, de nouvelles cibles thérapeutiques peuvent être identifiées et la validation de ces résultats sur des mammifères est plus aisée.

En outre, les modèles poissons offrent la possibilité d'analyser les effets de composés neurotoxiques sur le développement précoce. Comme l'illustre la figure 54, une modification au cours du développement peut conduire à des altérations morphologiques, des réseaux de neurotransmission ou encore du comportement. Les modèles poissons peuvent donc permettre de tester la neurotoxicité de nouveaux composés (Rico et al., 2011).

Comme présenté dans le chapitre précédent, l'étude du comportement alimentaire des poissons a une importance économique. Les poissons sont contraints de vivre avec une forte densité dans les fermes aquacoles. La prise en compte des comportements de ces espèces est importante car, par exemple, la mise en place de la territorialité pourrait entraîner de nombreux problèmes d'agressivité et entraîner des blessures voire des décès chez les animaux. Par ailleurs, le bien être des animaux est un sujet de plus en plus sensible au niveau du grand public. Sans compter que, d'un point de vue physiologique, le bien être du poisson permet d'éviter les facteurs de stress qui sont connus pour inhiber la croissance des individus. Ce point permet donc d'accroître la rentabilité de ces entreprises.

D'autre part, l'étude de la physiologie et du comportement des poissons peut être utilisée afin de prévenir des risques sanitaires liés à l'exposition aux polluants. Par exemple, les carpes *Carassius auratus* subissent un stress oxydatif et une inhibition de la croissance lorsqu'elles sont soumises à une exposition chronique de fullerène. L'activité de plusieurs enzymes est altérée dans l'ensemble de l'organisme mais le foie semble être l'organe le plus atteint (Zhu et al., 2008). Un autre exemple est l'exposition chronique aux polychlorobiphényles (PCB) qui induisent une diminution de la reproduction chez le poisson



**Figure 55 : Comportement de nage en banc des SF**

Les SF ont tendance à rester dans le compartiment B et à tenter de suivre le banc (Wilkins, 1988).

zèbre (Daouk et al., 2011). Ces polluants sont retrouvés dans le milieu naturel et la compréhension de leurs impacts sur les organismes permet de connaître les symptômes visibles chez les animaux sauvages afin de prévenir d'éventuels risques sanitaires.

## **II.4 Le modèle *Astyanax mexicanus* et la biologie du comportement**

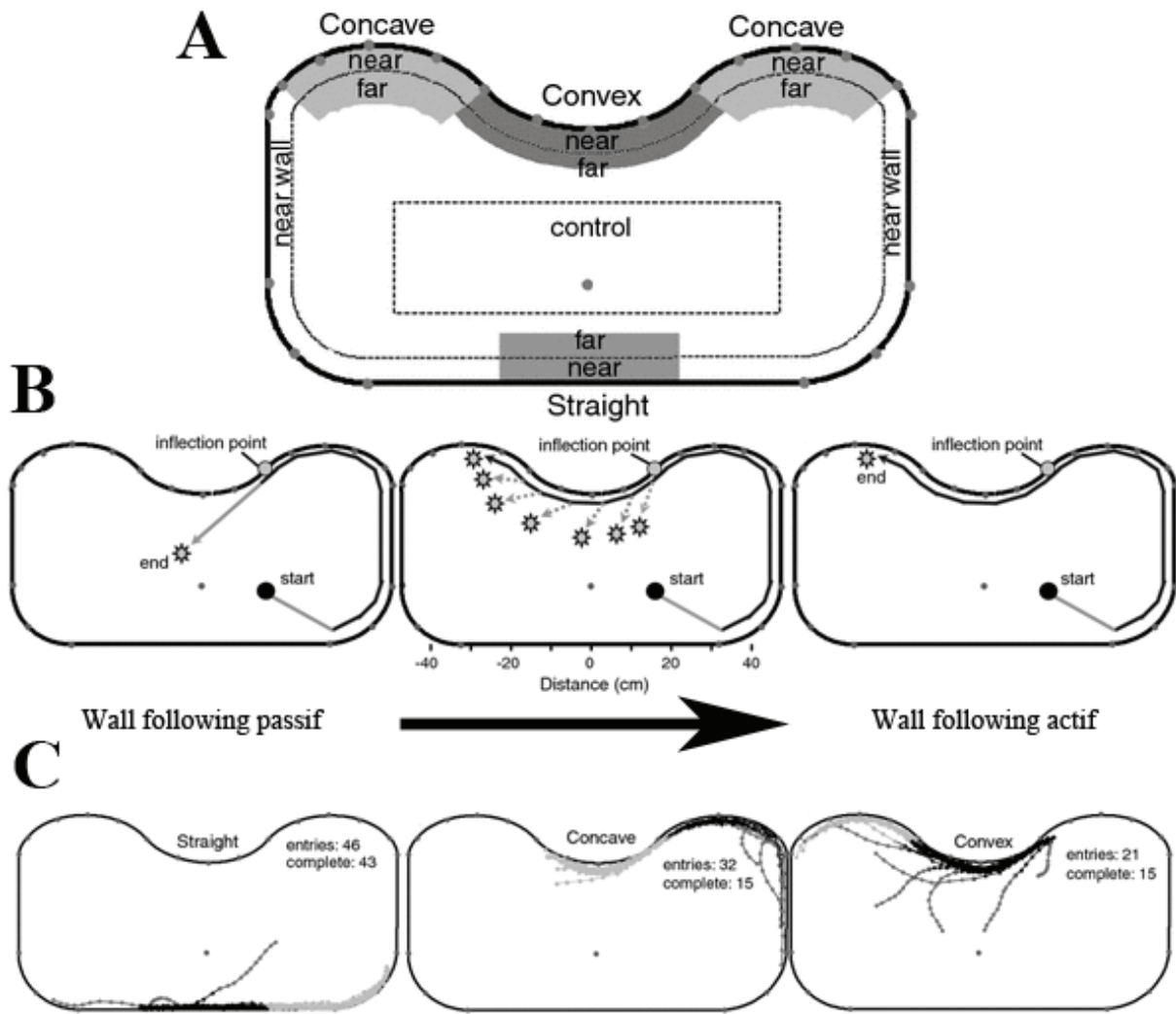
Les CF ne sont pas seulement morphologiquement différents des SF. Leurs comportements varient également sur de nombreux points, probablement suite aux variations morphologiques et développementales présentées précédemment. Les paragraphes suivants présentent les différences majeures qui sont observables.

### **II.4.1 Le comportement de nage**

Le comportement de nage en banc est considéré comme un caractère régressif chez les poissons cavernicoles (Wilkins, 1988). Les SF vivent naturellement en banc avec une organisation sociale et une hiérarchie forte. Ils ont un instinct grégaire fort, c'est-à-dire qu'un SF se rapprochera des autres s'il le peut (figure 55). A l'inverse, les CF ont tendance à nager librement et apparemment aucune interaction sociale n'a pu être mise en évidence. En laboratoire, des comportements similaires sont observés. Nicolas Rohner a montré que les SF s'intègrent et nagent à l'intérieur d'un banc fictif (les autres poissons étant des leurres reliés à un bras mécanique) alors que les CF n'ont pas d'interaction avec le banc fictif (Nicolas Rohner, présentation en congrès, 2011).

L'étude des populations hybrides montre que la nage en banc repose sur une base génétique. En effet, l'ensemble des individus F1 présente une diminution du comportement de nage. Les poissons issus de la F2 montrent quant à eux une forte variabilité de ce comportement, allant de la nage solitaire typique des CF à la formation de banc (comme les SF).





**Figure 56 : Le « wall following » des CF.**

(A) Boite utilisée pour l'expérience. Le poisson peut être près du mur (near) ou loin (far). La comparaison du temps que le poisson passe près des parois ou dans le rectangle central permet de déterminer s'il y a une tendance à suivre les bords. (B) Dans le cas où le poisson suit la paroi dans une partie concave, cela peut être dû à un comportement passif (le poisson n'ayant pas le choix). En revanche, lorsque la paroi est convexe, le « wall following » passif conduirait le poisson vers le centre du bac (B, à gauche) alors que le « wall following » actif permet à l'animal de suivre la paroi sur toute la longueur de cette portion (B, à droite). L'analyse de la position du point d'inflexion (B, au centre) permet d'identifier si ce comportement est plus ou moins actif.

Les CF ont une préférence à rester près des parois. De plus, l'analyse du comportement des CF (présenté en C) montre qu'ils réalisent un wall following actif car ils suivent la paroi à la fois lorsqu'elle est droite, concave mais aussi convexe (Patton et al., 2010).

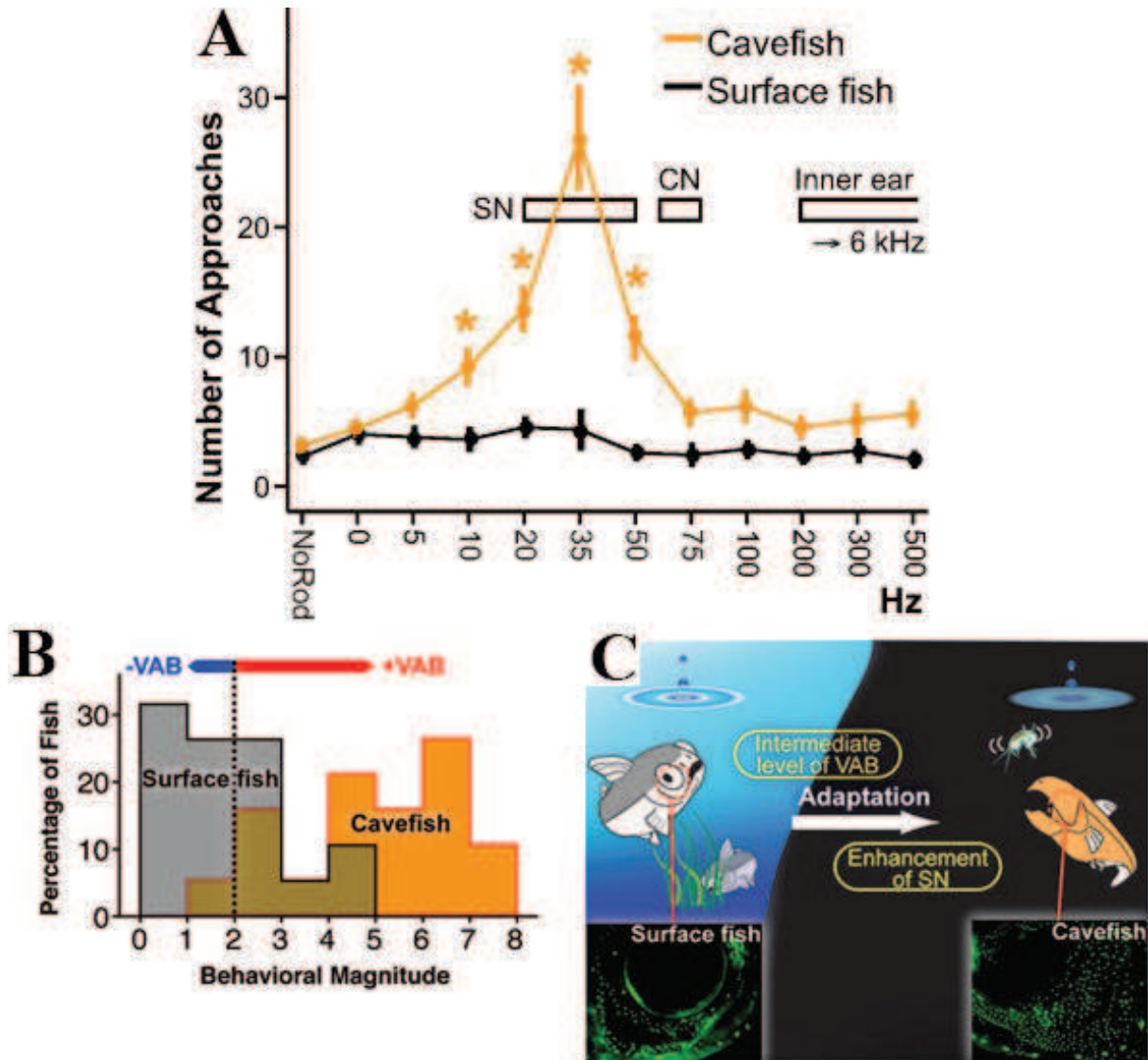
Si les poissons se retrouvent dans un espace restreint, les SF abandonnent la nage en banc. Dans ce cas, les poissons deviennent extrêmement agressifs les uns envers les autres et un comportement territorial se met en place. Dans ce même environnement, les CF n'ont pas de variation de comportement visible.

Cependant, les CF ont développé un comportement de nage différent de celui des SF. Dans leur habitat naturel, comme en aquarium, ceux-ci nagent à proximité des limites de leur espace (socle rocheux, bord de la mare en milieu naturel ou vitre de l'aquarium en milieu artificiel). On parle de « Wall-following ». Le wall-following n'est pas observé chez les SF. Comme le montre la figure 56, les CF suivent activement les parois car, même dans le cas d'une paroi convexe, ils ne s'éloignent pas. Patton a montré que ce comportement est fortement lié à la ligne latérale (Patton et al., 2010). Le wall-following permet d'éviter les collisions et d'explorer efficacement leur environnement. En l'absence de vision, la présence d'une paroi offre un point de repère qui leur permet de se déplacer dans une « carte virtuelle » (Sharma et al., 2009; Windsor et al., 2008, 2010).

#### **II.4.2 L'attraction par les vibrations**

Les SF et les CF réagissent différemment lorsque des vibrations sont faites à la surface de l'eau. Comme le montre la figure 57B, les SF n'approchent pas de la source des vibrations et ils ont tendance à fuir. A l'inverse, les CF ont tendance à s'approcher de la source (Yoshizawa and Jeffery, 2011; Yoshizawa et al., 2010, 2012). Ce comportement d'attraction est appelé VAB (pour vibration attractory behavior). Yoshizawa propose que ce comportement permet aux CF de trouver plus facilement de la nourriture dans les cavernes (Yoshizawa and Jeffery, 2011). Au contraire, les SF ne sont pas attirés par les vibrations car, d'une part, la vision prévaut dans les rivières et, d'autre part, la prédation est beaucoup plus forte dans l'environnement de surface (figure 57C).

Le VAB est possible grâce à la ligne latérale et aux neuromastes superficiels. En cas d'inhibition des neuromastes par des traitements pharmacologiques, les CF diminuent ce



**Figure 57 : Attraction des CF par les vibrations**

(A) Le graphique représente le nombre de fois où le poisson s'approche de la source des vibrations en fonction de la fréquence émise. Pendant les trois minutes du test, les CF sont attirés par les vibrations alors que les SF ne s'approchent pas (A et B). La fréquence à laquelle les CF répondent le mieux est 35Hz. Cela correspond aux fréquences permettant l'activation des neuromastes superficiels (SN), représentées par le rectangle blanc correspondant (figure A). La réponse est beaucoup plus faible lorsqu'elle correspond aux fréquences d'activation des neuromastes canaux de la ligne latérale (CN) ou de l'oreille interne (inner ear). Les neuromastes superficiels sont présentés par les points verts (figure C, en bas). La comparaison des SF et des CF montre que les neuromastes sont beaucoup plus nombreux chez les CF. (C) Yoshizawa propose que ce comportement est une adaptation à la vie cavernicole et que les CF s'approchent dans le but de rechercher de la nourriture alors que les SF ne s'approchent pas, craignant la prédation. D'après (Yoshizawa et al., 2010) (A) et (Yoshizawa and Jeffery, 2011) (B et C).

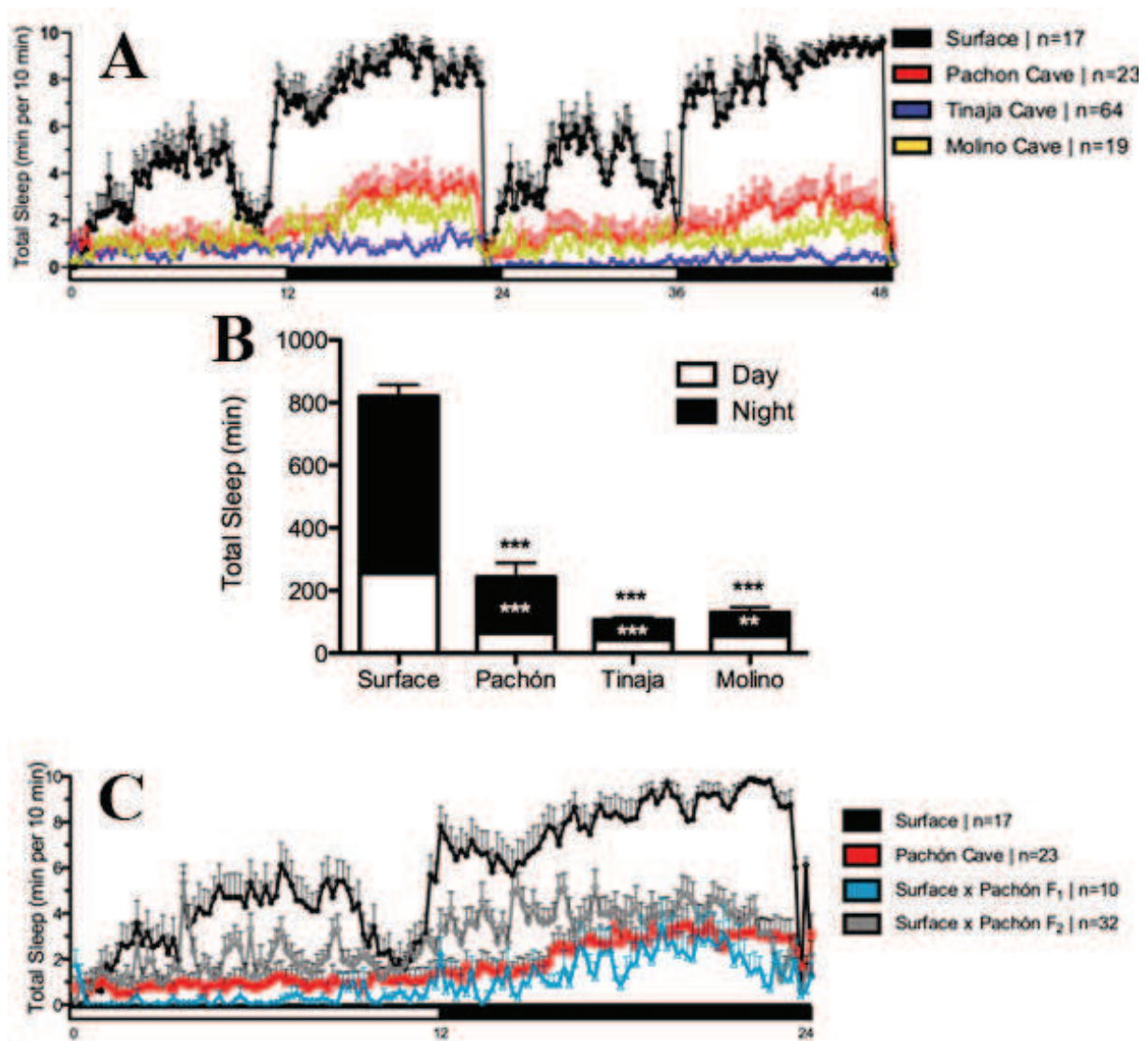
comportement. En cas d'ablation des neuromastes superficiels, un résultat similaire est obtenu (Yoshizawa and Jeffery, 2011) De plus, comme le montre la figure 57A, la fréquence de réponse maximum du VAB correspond à 35Hz, c'est-à-dire la meilleure fréquence pour l'activation des neuromastes superficiels (Yoshizawa et al., 2010).

Par ailleurs, le VAB semble également avoir une base génétique. Car l'analyse des populations hybrides montre qu'il existe une corrélation entre la taille de l'œil, le nombre de neuromastes et le VAB. Plus la taille de l'orbite oculaire est faible, plus le nombre de neuromastes est important et plus le VAB est observé (Yoshizawa et al., 2012).

### II.4.3 Le rythme circadien

Le rythme circadien repose sur le fonctionnement d'une horloge moléculaire interne. Les oscillateurs circadiens sont composés des molécules interlocked period / timeless (*per/tim*) et de Clock (*Clk*). Leurs boucles de rétroaction régulent la transcription de gènes cibles selon les différentes phases du cycle circadien (Dekens and Whitmore, 2008).

L'analyse de l'expression du gène *Per* en fonction du temps chez les SF et les CF de la caverne Chica montre que les cycles des animaux sont non seulement conservés chez les CF mais en plus ils sont synchronisés entre eux et en phase avec le cycle solaire (Christophe Guibal, données non publiées). L'explication la plus probable est la synchronisation secondaire des CF, c'est-à-dire qu'ils règlent leurs horloges internes sur un cycle variant lui-même par rapport au soleil. Les chauves-souris vivant dans ces cavernes sont les candidates les plus probables. En effet, d'importantes colonies de ces mammifères vivent accrochées au plafond des cavernes étudiées. Lorsque le soleil se couche, tous les individus sortent en même temps, provoquant ainsi d'importantes vibrations. De plus, le brassage de l'air résultant de leurs mouvements est responsable d'une variation perceptible de la température au fond de la grotte. Ces variations peuvent être responsables de la synchronisation des CF par rapport au soleil. Un autre paramètre pouvant expliquer ce phénomène est que les chauves-souris, rentrant dans les cavernes au lever du soleil après leur chasse, peuvent cycloser les CF en



**Figure 58 : Le sommeil des SF et des CF**

(A) Analyse des temps de sommeil de SF ou de CF issus de différentes populations (Cf. le code couleur) au cours des phases lumineuses et d'obscurité. L'alternance lumière/obscurité est représenté par les barres claires/sombres. Les CF n'ont pas le rythme des SF et (B) l'analyse du temps de sommeil total (sur une journée) indique que leur temps de sommeil est réduit de plus de 70%. (C) l'analyse de populations hybrides montre que les F1 se comportent comme les CF alors que les F2 présentent un phénotype intermédiaire entre les SF et les CF, suggérant que la perte du sommeil est sous l'influence de facteurs génétiques (Duboué et al., 2011).

déféquant dans les mares d'eau. Il est connu que des animaux peuvent être cyclés grâce à l'apport de nourriture.

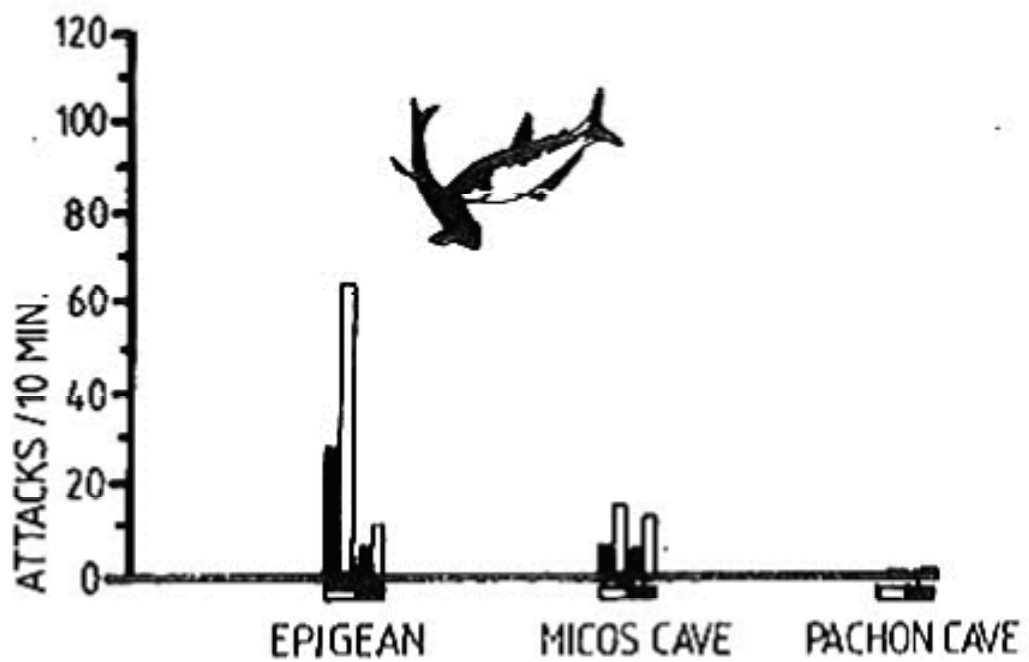
La glande pinéale est une région importante du cerveau des vertébrés qui a un rôle dans la détection de la lumière (via des photorecepteurs), les sécrétions neuroendocrines et le contrôle du rythme circadien. Cette dernière fonction est effectuée par la sécrétion de la mélatonine. Cette glande est parfaitement fonctionnelle chez les CF (Yoshizawa and Jeffery, 2008). Par conséquent, en laboratoire, nos CF ont un cycle synchronisé directement par la lumière.

Bien que les différents mécanismes d'horloge interne soient opérationnels chez les CF, l'étude de l'activité des poissons montre que leur cycle de sommeil est altéré. Les études de Duboué montrent que différentes populations de CF conservent une activité même en période de nuit. Comme l'indique la figure 58B, les CF ont perdu 70 à 80% de leur temps de sommeil. L'auteur propose que cette évolution permette d'accroître le période de veille afin d'augmenter le temps que le poisson passe à chercher de la nourriture (Duboué et al., 2011).

La perte du sommeil possède également une base génétique. Comme le montre la figure 58C, les hybrides F1 ont un profil typique des CF alors que les F2 présentent des phénotypes variables (en moyenne, intermédiaires aux deux autres phénotypes). Cette perte est donc due à des allèles dominants chez le CF et, d'après l'auteur, un faible nombre de loci sont impliqués dans ce caractère (Duboué et al., 2011).

#### **II.4.4 Le comportement agressif**

Le comportement agressif est modifié chez les poissons cavernicoles (Wilkens, 1988). Breder a décrit le comportement agressif des poissons de surface comme « une méchanceté erratique » (Breder and Rasquin, 1943). L'agressivité se manifeste par différentes réactions : tout d'abord, les nageoires s'étendent puis la tête s'abaisse et le corps adopte une position oblique. Le comportement de nage se modifie, les poissons de surface nagent « comme des



**Figure 59 : Agressivité des *Astyanax***

Fréquence des attaques (en noir) ou des tentatives (en blanc) des SF (epigean) ou des cavernicoles issus de la population Micos ou Pachón. D'après (Wilkins, 1988).

serpents » et tournent en cercle. Le plus haut degré de manifestation d'agressivité est caractérisé par le pilonnage de l'intrus et la morsure (Wilkens, 1988). Les individus soumis, s'ils n'ont pas la possibilité de se cacher ou de fuir, sont tués.

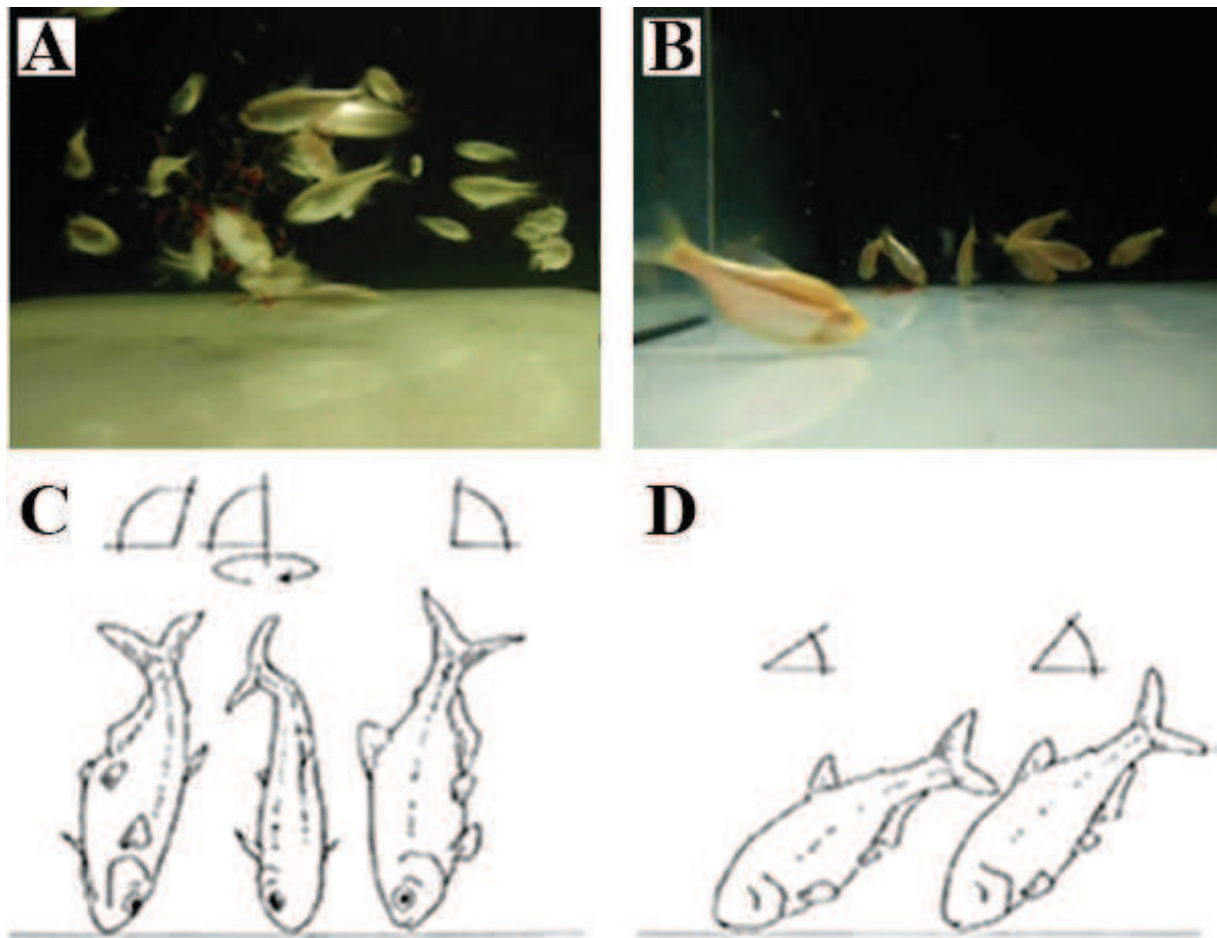
De plus, des études avaient permis de démontrer que les SF étaient plus agressifs que toutes les populations CF. L'ensemble des populations cavernicoles, exceptée la population Molino, ont perdu leur agressivité (Burchards et al., 1985; Espinasa et al., 2005; Wilkens, 1988). La perte d'agressivité des CF n'est pas une conséquence du phénotype aveugle : pour éliminer la composante visuelle dans le comportement agressif, des SF avaient été rendus aveugle par énucléation. Si l'opération se fait à l'âge adulte, les poissons sont désorientés et ne sont plus agressifs. En revanche, si l'énucléation est réalisée au stade 24-30h post-fécondation, les SF sont aveugles et conservent leur agressivité (Espinasa et al., 2005).

Le comportement agressif possède donc une base génétique. Les descendants F2, résultant de croisements entre poissons de surface x populations cavernicoles Pachón, présentent un niveau d'agression intermédiaire. Les descendants issus du croisement entre un hybride F1 et un cavernicole ne présentent plus de comportement agressif (Wilkens, 1988).

#### **II.4.5 Le comportement alimentaire**

Les poissons cavernicoles et les poissons de surface ont un comportement différent lors de la prise alimentaire (Jeffery, 2008; Schemmel, 1980; Wilkens, 1988). Là où les SF ont naturellement tendance à chasser en banc en pleine eau (figure 60A), les CF ont eux tendance à « ratisser » le fond à la recherche de nourriture (figure 60B), en se plaçant avec un angle de 45° par rapport au fond (figure 60D). Dans un aquarium placé dans le noir, les poissons de surface se nourrissent inefficacement en « piquant » le fond de l'aquarium, c'est-à-dire en positionnant leurs corps perpendiculairement au fond de l'aquarium (figure 60C). En présence de lumière, ce comportement les rend beaucoup plus efficace que les CF pour fouiller les fonds (Schemmel, 1980). En revanche, lorsque les CF et les SF sont mis en compétition dans le noir avec une source de nourriture limitée, les CF sont plus performants alors que les SF jeûnent (Langecker et al., 1995). L'utilisation de leurs mâchoires plus larges





**Figure 60 : Comportement de recherche alimentaire des *Astyanax***

A la lumière, les SF chassent la nourriture (ici, des vers de vase) en banc et en pleine eau (A) alors que les CF cherchent la nourriture dans le fond (B). Dans l'obscurité, les SF recherchent la nourriture dans le fond, en « piquant », avec un angle de  $90^\circ$  (C) alors que les CF se déplacent en suivant le fond avec un angle de  $45^\circ$  (D) (Schemmel, 1980).

les rend plus efficaces pour se nourrir. Ce comportement alimentaire est unique chez les populations cavernicoles et serait donc adaptatif à la vie souterraine.

L'analyse des populations hybrides montre que ce comportement de prise alimentaire est contrôlé génétiquement (Wilkins, 1988).

Les variations de comportement entre les populations suggèrent que les adaptations comportementales subtiles des CF sont nécessaires pour la survie et la colonisation du milieu cavernicole. Toutes ces modifications sont des traits complexes, et peuvent probablement être induites par des variations subtiles de l'agencement des réseaux neuronaux et de la taille spécifique de certaines régions cérébrales.



# Résultats et discussions

## I Evolution du comportement agressif et du système sérotoninergique

### I.1 Présentation des articles

Dès le début de ce projet, nous savions qu'il existait des modifications du comportement des populations cavernicoles. En particulier, comme expliqué dans la partie II.4.4, quelques études avaient montré que les populations de CF, excepté la population Molino, avaient perdu l'agressivité qui est un caractère typique des SF.

La perte du comportement agressif est particulièrement intéressante.

- D'une part, il existe un lien fort entre l'agressivité et la sérotonine chez les vertébrés (Dennis et al., 2008, 2013; Heiming et al., 2013; Jansen et al., 2011; Larson and Summers, 2001; Naumenko et al., 2013; Saudou et al., 1994) y compris chez les poissons (Höglund et al., 2001; Lynn et al., 2007; Norton and Bally-Cuif, 2010; Winberg et al., 2001). Lynn a montré que, chez le poisson combattant *Betta splendens*, une augmentation du taux de sérotonine par l'utilisation de traitements pharmacologiques permet de diminuer l'agressivité des mâles et stoppe les combats à mort qu'ils se livrent habituellement (Lynn et al., 2007).



- D'autre part, les études antérieures de notre équipe avaient montré que les CF possèdent un hypothalamus plus large que les SF (Menuet et al., 2007; Pottin et al., 2011). Par ailleurs, nous savions que des neurones sérotoninergiques sont localisés dans l'hypothalamus des poissons, entre autres chez l'épinoche (Ekström and Van Veen, 1984; Ekström et al., 1985), chez le poisson zèbre (Sallinen et al., 2009) et chez l'*Astyanax* (à l'origine, données non publiées de l'équipe puis Elipot et al., 2013).

Notre hypothèse de départ était que la modification développementale due à l'extension du territoire d'expression de *Shh* avait pu induire une modification du système sérotoninergique dans l'hypothalamus des CF et conduire à la perte du comportement agressif chez eux.

Les premières difficultés qu'il a fallu prendre en compte dans cette étude sont les contraintes associées au phénotype aveugle des populations cavernicoles. En effet, d'un point de vue comportemental, le test de référence utilisé pour étudier l'agressivité chez les vertébrés est le test du miroir (Chang et al., 2012; Clotfelter and Kuperberg, 2007; Hirschenhauser et al., 2008; Lynn et al., 2007). Malheureusement, le phénotype aveugle des populations cavernicoles est incompatible avec ce test. C'est la raison pour laquelle j'ai adapté un protocole intrus-résident que j'ai utilisé ensuite pendant tout le projet.

Des juvéniles de quatre mois sont placés individuellement dans des cuves contenant 200mL d'eau pendant une nuit pour qu'ils puissent s'habituer à ce nouvel environnement. Aucun contact physique ou visuel n'est possible pendant cette période. Au matin, les intrus sont ajoutés dans les cuves des alevins testés. Les alevins testés et intrus sont de tailles similaires. Le test consiste à quantifier le nombre d'attaques au cours du temps entre les deux poissons pendant une heure. On appelle attaque l'ensemble des événements de charge d'un poisson associé à un comportement de fuite du poisson chargé. Ces analyses sont réalisées à l'aide du logiciel ODRec, développé par Samuel Péan (<http://www.samuelpean.com/>).



Pour coupler le comportement des poissons aux structures de leurs systèmes nerveux, j'ai eu recours à des études comportementales, histologiques, biochimiques, pharmacologiques, génétiques et développementales. Les résultats sont présentés dans les deux articles ci-dessous. Le premier a été publié dans le journal « Current Biology » en 2013 et est intitulé « Evolutionary Shift from Fighting to Foraging in Blind Cavefish through Changes in the Serotonin Network ».

Suite à cette publication, l'éditeur en chef de « Communicative and integrative biology » (Frantisek Baluska) nous a proposé d'écrire un commentaire sur nos données. Nous avons utilisé cette opportunité pour soumettre un « addendum », dans lequel nous discutons plus précisément nos résultats dans un cadre évolutif. Cet article s'intitule « Feed or fight: A behavioral shift in blind cavefish ».

## **I.2 Publications des travaux**



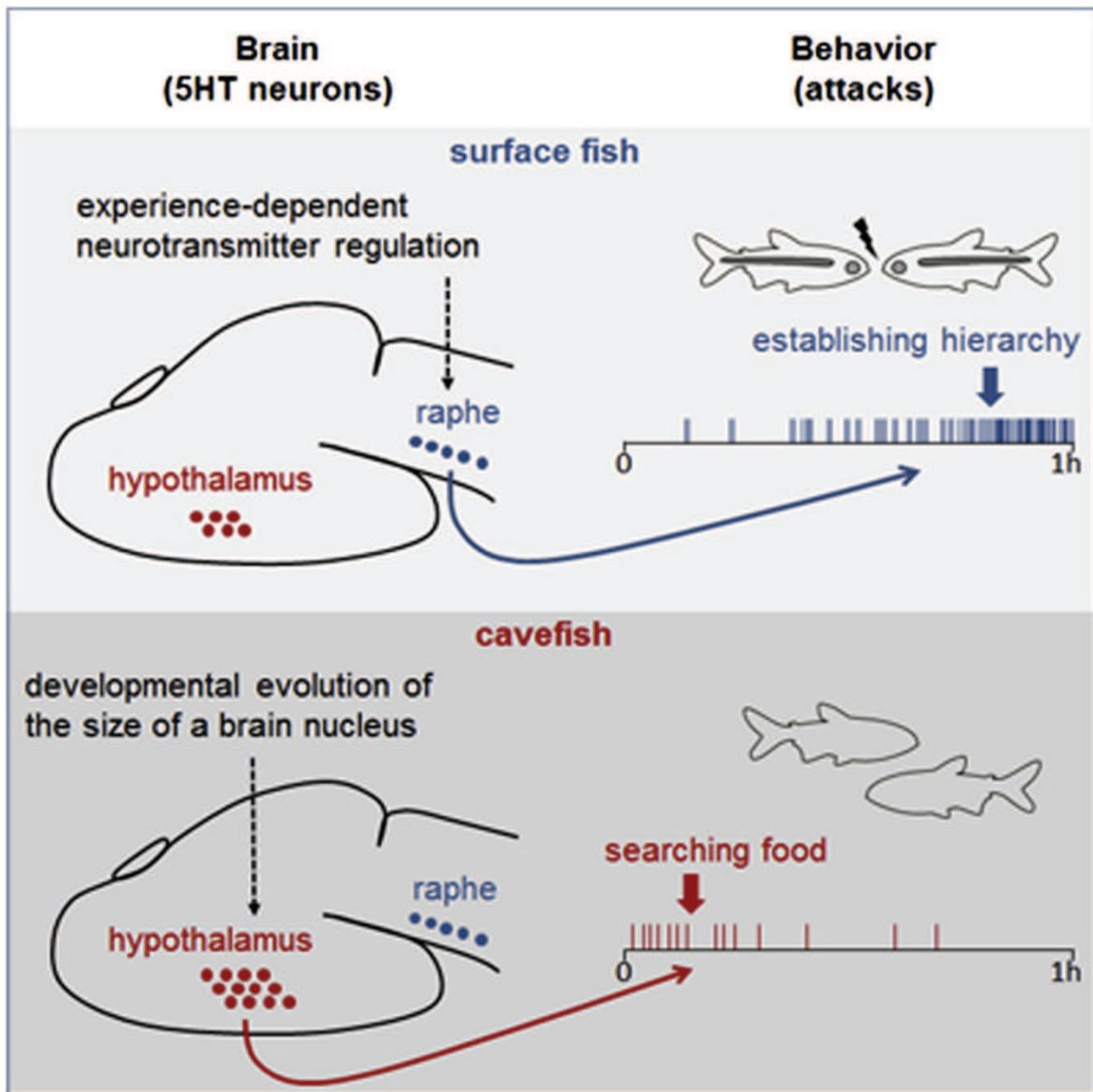


# **Evolutionary Shift from Fighting to Foraging in Blind Cavefish through Changes in the Serotonin Network**

Publication N° 1 publiée dans le journal

**Current Biology**





Graphical abstract



# Evolutionary Shift from Fighting to Foraging in Blind Cavefish through Changes in the Serotonin Network

Yannick Elipot,<sup>1</sup> Hélène Hinaux,<sup>1</sup> Jacques Callebert,<sup>2</sup> and Sylvie Rétaux<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Equipe Développement Evolution du Cerveau Antérieur, UPR3294 Neurobiologie et Développement, CNRS, Institut Alfred Fessard, 91198 Gif-sur-Yvette, France

<sup>2</sup>Service Biochimie et Biologie Mol culaire, Hôpital Lariboisi re, 75475 Paris, France

## Summary

**Background:** Within the species *Astyanax mexicanus*, there are several interfertile populations of river-dwelling sighted fish and cave-dwelling blind fish which have evolved morphological and behavioral adaptations, the origins of which are unknown. Here, we have investigated the neural, genetic, and developmental bases for the evolution of aggressive behavior in this teleost.

**Results:** We used an intruder-resident behavioral assay to compare aggressiveness quantitatively (attack counts) and qualitatively (pattern and nature of attacks) between the surface and cave populations of *Astyanax*. Using this paradigm, we characterize aggressive behavior in surface fish, bring support for the genetic component of this trait, and show that it is controlled by raphe serotonergic neurons and that it corresponds to the establishment of dominance between fish. Cavefish have completely lost such aggressive/dominance behavior. The few attacks performed by cavefish during the behavioral test instead correspond to food-seeking behavior, driven by the developmental evolution of their hypothalamic serotonergic paraventricular neurons, itself due to increased Sonic Hedgehog signaling during early forebrain embryogenesis.

**Conclusions:** We propose that during evolution and adaptation to their cave habitat, cavefish have undergone a behavioral shift, due to modifications of their serotonergic neuronal network. They have lost the typical aggressive behavior of surface fish and evolved a food-seeking behavior that is probably more advantageous to surviving in the dark. We have therefore demonstrated a link between the development of a neuronal network and the likely adaptive behaviors it controls.

## Introduction

The Mexican tetra *Astyanax mexicanus* exists under two morphs: sighted river morphs inhabiting the streams of Mexico, and 29 populations of blind and depigmented cavefish morphs living in caves of the Sierra del Abra region, Mexico. Being from the same species and having diverged about one million years ago, these fish constitute an outstanding model for evolutionary biology [1, 2].

At first the cavefish eyes were thought to degenerate because they were useless in caves [3]. Then, it was proposed that eye and pigment loss was almost entirely the result of the

accumulation of morphologically reducing, selectively neutral mutations [4]. More recently, emphasis was given to the importance of selection on constructive traits and indirect effects on regressive traits, through mutations in pleiotropic developmental genes [5]. “Evo-devo” studies bring some support to the latter scenario. Actually, in addition to the loss of their eyes, cavefish have larger olfactory bulbs and hypothalamus [6], more taste buds, more teeth, larger jaws [7], and more neuromasts [8, 9]. Many of these anatomofunctional changes are due to embryonic modifications in morphogen signaling, namely Sonic Hedgehog (Shh) and Fibroblast Growth Factor (Fgf8) [10, 11]. These early signaling changes are indirectly responsible for lens apoptosis and thus eye degeneration [11], but they also induce the development of an enhanced gustatory apparatus [7], of larger olfactory epithelium and olfactory bulbs, and of a larger hypothalamus [6, 10]. It is likely, even though it is not yet demonstrated, that these changes in sensory and neuroendocrine systems are adaptive.

Cavefish and surface fish behavior is also very different, with important modifications concerning feeding and social behavior. Cavefish are bottom feeders and explore the substrate at a precise 45° angle [4]; they evolved a “vibration-attraction behavior” to locate food dropping onto the water surface [9]; they display modified swimming kinematics and a “wall-following” behavior to avoid collisions and explore their environment [12–14]; they have lost sleep, supposedly to increase wakefulness and chances to find food [15]; cavefish do well, in food competition experiments in the dark, whereas surface fish starve [16]; and cavefish have lost the aggressive behavior that is a trademark of their surface-fish counterparts [17–19]. These many and subtle behavioral adaptations are likely responsible for cavefish survival and success during cave colonization. They represent complex traits, due to many and subtle changes in specific brain regions.

We focused on the loss of aggressiveness in cavefish. We characterized aggressive behavior in the two *Astyanax* morphs, assessed its genetic basis, demonstrated the role of serotonin in the process, and investigated the developmental origin of the modifications in serotonergic network and behavior in cavefish.

## Results

To compare aggressiveness in sighted surface fish (SF) and blind cavefish (CF) the classic “mirror test” is inappropriate. We used an “intruder assay” (see Figure S1A available online). Two fishes were habituated overnight in separate 200 ml tanks. The next morning, one fish was transferred into the tank of the other, and their behavior was immediately recorded for 1 hr.

### Surface Fish and Cavefish Show Quantitative and Qualitative Differences in Aggressive Behavior

SF were ten times more aggressive than Pach on CF in the intruder assay (Figure 1A and Movies S1 and S2). During 1 hr, two SF attacked each other more than 1,000 times ( $1,132 \pm 103$ ;  $n = 57$ ), whereas two Pach on CF attacked each other about 100 times ( $110 \pm 11$ ;  $n = 56$ ). This quantitative

\*Correspondence: [retaux@inaf.cnrs-gif.fr](mailto:retaux@inaf.cnrs-gif.fr)



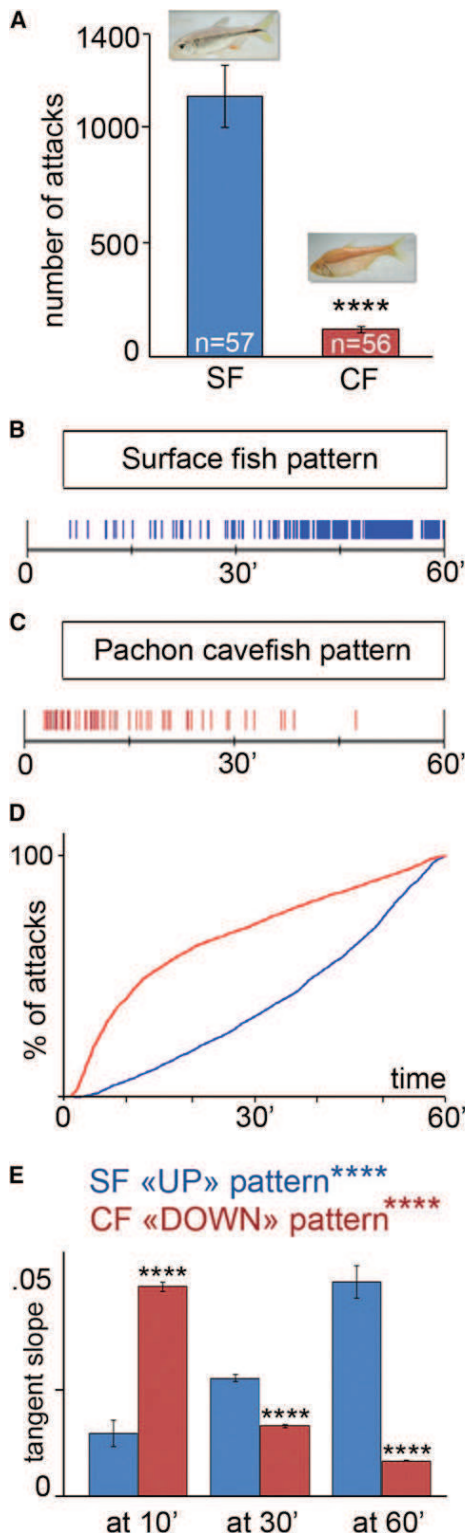


Figure 1. Characterization of Aggressive Behavior in Surface Fish and Its Loss in Blind Cavefish

(A) Number of attacks counted during 1 hr between two surface fish (SF, blue) or between two blind cavefish (CF, red). In this and following figures, the n given in colored bars indicates the number of tests performed (hence the number of animals tested is 2n).

(B and C) Typical ODRec graphs showing the distribution of attacks as a function of time along the 1 hr test in a SF (B, blue) and in a CF (C, red).

difference was accompanied by a qualitative difference in the pattern of attacks (Figures 1B and 1C). SF performed few attacks in the first 15 min, then became more aggressive and attacked with high frequency in the second half of the test (Figure 1B). Conversely, CF performed some attacks in the first 15–20 min and then swam quietly (Figure 1C). In order to assess the statistical significance of this difference in the pattern of attacks as a function of time, we used normalized cumulative curves and calculated the slopes of the tangents to these curves at three time points (10, 30, and 60 min; Figures 1D and S1B). The slopes of tangents therefore represent the frequency of attacks at a given moment of the test. The polynomial curves exhibited by SF resulted in a typical and significant “up” pattern for the slopes of tangents at the three time points (Figures 1D and 1E, blue), whereas the logarithmic curves exhibited by CF resulted in a typical and significant “down” pattern (Figures 1D and 1E, red). At the three time points examined, the slope values were different between SF and CF, showing that the pattern difference between the two *Astyanax* morphs is statistically significant. These results demonstrate that CF have lost most of the aggressive behavior that is a hallmark of their SF counterparts and that the “intruder assay” allows the detection of quantitative and qualitative behavioral differences.

#### Attacks in SF Are Not Visually Driven, but Are Facilitated by Vision

We next tested whether the lack of aggressive behavior in CF is due to their lack of vision.

First, we blinded SF early in development by bilateral removal of their eye lenses at 40 hpf (hours postfertilization). Such early surgical lens ablation mimics the CF condition, in which the apoptotic lens induces eye degeneration [18, 20, 21]. Lens-ablated SF presented degenerated eyes at 3 months (Figures 2A and 2B), and their optic tectum contralateral to the ablated eye was hypomorphic (Figure 2C) (see also [22]). Their visual sense was absent when tested in a fear-predator test (Movie S3). Blind, bilaterally lens-ablated SF performed fewer attacks than siblings that were not operated on (Figure 2D, green), but they still attacked significantly more than CF. Their pattern was “up” and indistinguishable from sighted SF controls (Figure 2E).

Second, the resident-intruder assays were conducted in the dark, using infrared recordings. In these conditions, SF (and CF) behaved exactly alike in the light, both in terms of attack counts and attack patterns (Figures 2D and 2E, dark blue/red). These data suggest that there is no requirement for vision in the expression of the SF aggressive behavior.

#### Loss of Aggressive Behavior in Independently Evolved Cavefish Populations

Parallel phenotypic diversification in closely related animals is a rigorous framework for testing the role of natural selection in

(D) Normalized cumulative attack counts expressed as a percentage of total attacks and as a function of time in SF (blue) and in CF (red).

(E) Slopes of the tangents of the cumulative curves in (D), respectively, taken at three time points during the test: 10, 30, and 60 min, in SF (blue, n = 57) and in CF (red, n = 56). For a detailed and complete description of the method used, see Figure S1. Asterisks indicate  $p < 0.0001$  (Mann-Whitney) when comparing corresponding values in SF and CF.

In this and the following figures, asterisks indicate significant differences in attack counts (Mann-Whitney). The pattern indicated (“down,” “up,” or “flat”) for each condition was statistically tested (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney), and its p value is also given in asterisks.





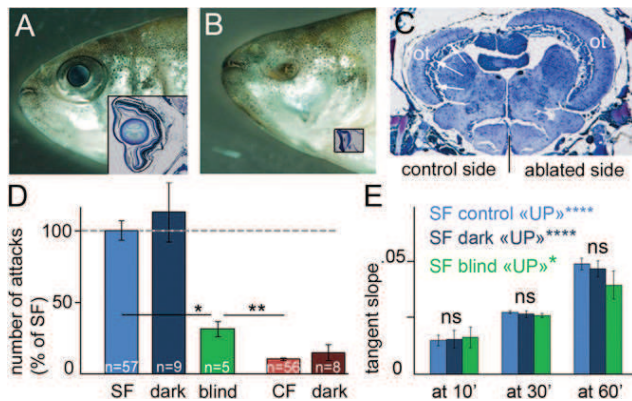


Figure 2. Aggressive Behavior in Lens-Ablated SF

(A and B) Photographs showing a normal SF eye and the eyeless phenotype in a 3-month-old SF which was lens-ablated at 40 hpf. Insets show toluidine blue counterstained sections of the normal and the degenerated vestigial eye, respectively. (C) Section at the level of the optic tectum (ot) in a 3-month-old SF which was unilaterally lens ablated at 40 hpf. The contralateral ot (arrows) is severely reduced. See also *Movie S3* for a functional visual test used to assess the blind phenotype of bilaterally lens-ablated SF. Paraffin sections were colored by Cresyl-Luxol method. (D) Number of attacks counted during one hour between two SF (blue), two SF in the dark (dark blue), two blinded SF (green), two CF (red), or two CF in the dark (dark red) expressed as a percentage of SF attack number. (E) Slopes of the tangents of the cumulative curves at 10, 30, and 60 min compared between SF (blue), SF in the dark (dark blue) and blind SF (green), allowing for comparison of the patterns of attacks. They are indistinguishable, all of the “up” SF type.

evolution [23]. We therefore analyzed the behavior of the Molino cavefish population, which is derived from a different ancestral stock than Pachón [24, 25]. Here, adult Molino fish were used because we are unable to breed the Molino population in the lab. Molino behavior was compared to the behavior of SF and Pachón adults, which was identical to the behavior of 3-month-old SF and Pachón fishes, respectively (compare *Figures 1A and 1E, 3A and 3B*). Molino performed few attacks, therefore behaving like Pachón (*Figure 3A*, orange). Their strikes were, however, uniformly distributed over the 1 hr test, resulting in identical attack frequencies along the test, and consequently in a “flat” pattern (*Figure 3B*).

**Aggressive Behavior in SF and Its Loss in CF Are Genetically Encoded**

The results above suggested that aggressiveness in SF and its loss in CF may be due to genetic differences, as previously suggested for the Piedras cavefish population [26]. We tested this hypothesis in two ways.

First, SF were grown at different population densities from the third day after hatching to the age of 3 months: either single (no physical/visual contact with other fish), or in groups of 30 or 300 individuals. Aggressiveness was quantitatively and qualitatively indistinguishable between the three types of husbandry (*Figures 3C and 3D*). Thus, a SF which has never seen another fish will “naturally” attack a congener.

Second, we generated F1 hybrids from several combinations of surface and cave populations. SFxCF F1 hybrids have slightly reduced eyes but are fully visual. They showed extreme aggressiveness (especially for ♀SF x ♂Molino) and displayed an “up” pattern (♀Pachón x ♂SF) or a “flat” pattern

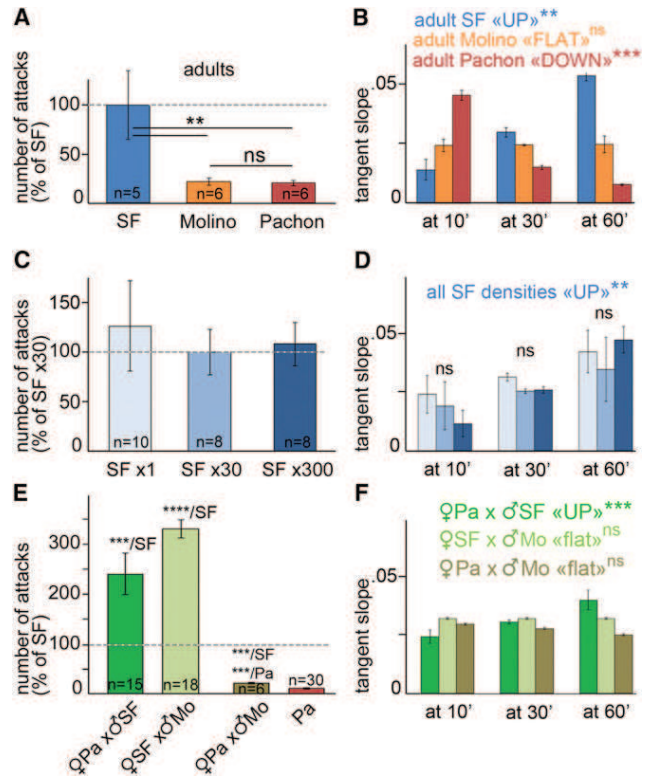


Figure 3. Aggressive Behavior in SF and Its Loss in CF Are Genetically Encoded

(A, C, and E) Number of attacks counted during 1 hr between two adult fish from different cave populations (A: SF, blue; Molino, orange; Pachón, red), between two 3-month-old SF raised at varying population densities (C: alone, light blue; by group of 30 as per usual, blue; by group of 300, dark blue), or between two 3-month-old fish from various F1 hybrid combinations (E: green and brown), and the number is expressed as a percentage of SF attack numbers. (B, D, and F) Slopes of the tangents of the cumulative curves at 10, 30, and 60 min corresponding to experimental conditions in (A), (C), and (E), respectively, and allowing for comparison of the patterns of attacks (same color codes as in A, C, and E).

(♀SF x ♂Molino) (*Figures 3E and 3F*, green). This unanticipated finding suggests that aggressive behavior is a complex trait and may involve a heterosis effect in hybrids. Conversely, the ♀Pachón x ♂Molino cross resulted in blind F1 hybrids performing few attacks, like their parent cave populations, with a “flat” pattern, like Molino (*Figures 3E and 3F*, brown).

Altogether these data suggest that *Astyanax* aggressive behavior is genetically encoded, with SF alleles causing high aggressiveness, and that this trait has been repeatedly lost, at least partly through the same genes, during the evolution of CF populations.

**Aggressive Behavior in Surface Fish Is Linked to Serotonergic Neurotransmission**

Serotonin (5HT) is notoriously linked to aggressive behavior in vertebrates, including fish [27–30]. We therefore investigated whether the 5HT neurotransmission was involved in SF attacks. We treated SF with fluoxetine [31], a selective serotonin reuptake inhibitor, or deprenyl [32], an inhibitor of monoamine oxidase (MAO, the serotonin-degrading enzyme; note, there is only one MAO in fish [33, 34]). Both compounds were



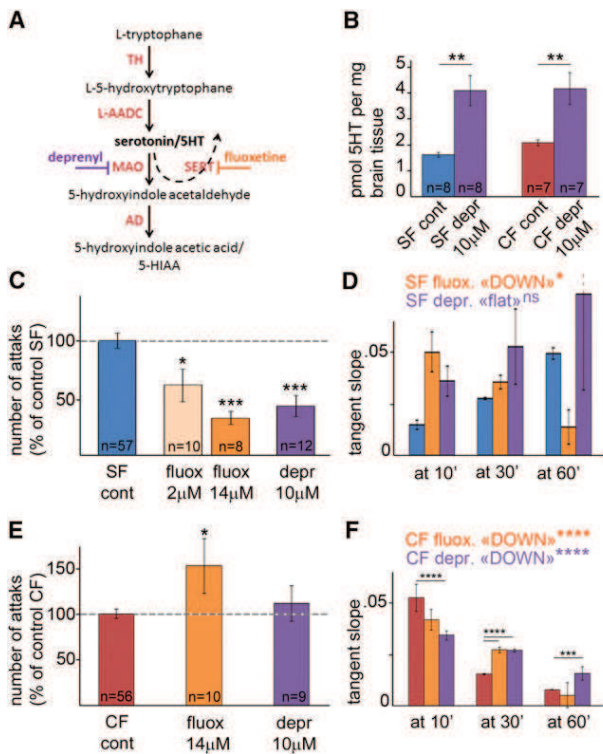


Figure 4. Aggressive Behavior in SF Is Linked to Serotonergic Neurotransmission

(A) Schema of the serotonin synthesis, reuptake, and degradation pathway, indicating the level of action of the two compounds used. TH, tryptophane hydroxylase; L-AADC, L aromatic amino-acid decarboxylase; MAO, monoamine oxidase; SERT, serotonin transporter; AD, aldehyde dehydrogenase.

(B) HPLC measurement of 5HT in dissected SF and CF brains in the indicated conditions. SF, blue; CF, red; deprenyl-treated, purple.

(C and E) Number of attacks counted during 1 hr after pharmacological treatment in SF (C) and in CF (E) and expressed as a percentage of attack number in the control population.

(D and F) Slopes of the tangents of the cumulative curves at 10, 30, and 60 min corresponding to experimental conditions in (C) and (E), respectively, and allowing for comparison of the patterns of attacks (same color codes as in C and E).

expected to increase brain 5HT levels, although through completely different mechanisms (Figure 4A). Deprenyl efficiency was confirmed by high-pressure liquid chromatography (HPLC) dosage: 5HT levels were increased 2.5 times in the brains of treated fish (Figure 4B, purple), and the levels of 5HIAA metabolite were strongly decreased as expected (−90% in SF; −84% in CF;  $p < 0.001$ ). The effect of deprenyl was identical on SF and CF. Importantly, neither dopamine nor noradrenalin levels were modified (Figure S2B).

In the behavioral test, SF treated with varying concentrations of fluoxetine or with deprenyl showed a dose-dependent decrease in the number of attacks (Figure 4C, orange/purple), showing that aggressiveness and brain 5HT levels are inversely correlated in SF. However, SF with pharmacologically induced high 5HT levels were still significantly more aggressive than CF. Importantly, the decrease in SF aggressiveness after pharmacological treatment was not due to a modification of swimming behavior/locomotion (Figure S2A).

The pattern of attacks was also modified in SF after pharmacological treatments (Figure 4D). Fluoxetine-treated SF

showed a Pachón-like, “down” pattern, with attack frequencies identical to control CF values at 10 and 60 min. After deprenyl, the “up” pattern was abolished, and the frequency of attacks was highly variable at the end of the test. These data demonstrate that interfering with 5HT neurotransmission modifies both quantitative and qualitative aspects of aggressiveness in SF, in a manner that tends to phenocopy the CF type of behavior.

Finally, aggressive behavior was tested in Pachón CF with increased 5HT levels. Fluoxetine but not deprenyl increased the number of attacks when compared to control CF (Figure 4E). Qualitatively, the two drugs had the same slight effect on the pattern of attacks, i.e., a lengthening of the aggressive period, resulting in a significantly attenuated “down” pattern (Figure 4F). Thus, in cavefish, interfering with 5HT neurotransmission has moderate effects on aggressive behavior.

### Attacks in SF and CF Are Not Equivalent

Because the pattern of attacks was both population and serotonin dependent, we asked about the significance of this pattern difference between the two morphs.

We hypothesized that CF attacks, occurring during the first minutes of the test, may correspond to food-seeking behavior. Indeed, these blind animals may interpret the vibrations induced by the other fish as potential food. The hypothesis is also supported by the fact that (1) sighted SF do not attack in the first minutes, (2) serotonin is known to regulate feeding and appetite, and (3) CF with increased 5HT levels have a slightly increased aggressive period.

We raised three groups of fish under different diets during 3 weeks: they were fed normally, overfed, or starved. Cavefish aggressiveness was inversely correlated to food intake, with overfed CF attacking significantly less than starved CF (Figure 5A), a result consistent with the food-seeking hypothesis. The pattern of attacks was “down” in the three feeding conditions (Figure 5B), suggesting that CF attacks occurring early in the test and resulting in the typical Pachón “down” pattern correspond to food-seeking behavior.

The opposite result was found for SF, with attack counts positively correlated to food intake (Figure 5C). Whereas normally fed SF showed an “up” pattern, starved and overfed SF showed a “flat” pattern that was due to modified attack frequencies at 10 and 60 min (Figure 5D). This suggests that, in normal conditions, SF attacks do not correspond to food-seeking behavior. Only when SF are hungry do they slightly increase their attack frequency at the beginning of the test.

As SF start attacking after a 20–25 min period of observation, we hypothesized that their strikes may correspond to the establishment of hierarchy between the two fish. This is also supported by the fact that SF, but not CF, display schooling behavior (Figure S3; [35]). Because the typical “up” pattern of SF attacks is affected after 5HT pharmacological manipulations, we predicted that hierarchical order should be related to 5HT brain levels.

Groups of 12 SF were left together for 1 week, allowing for a hierarchical order to be firmly established in the school. The day of the experiment, careful 10–15 min observations unambiguously identified the highly dominant fish (one per tank) from the subordinate fish (two or three per tank). We measured the 5HT brain levels of dominant and subordinate fish by HPLC, after dissecting out the posterior part of the brain, which contains hindbrain raphe 5HT neurons, from the anterior part, which contains hypothalamic 5HT neuronal



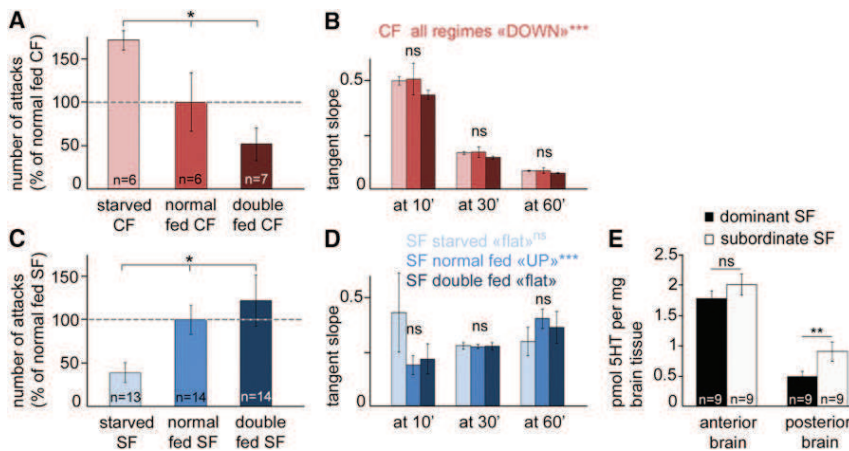


Figure 5. Aggressiveness, Feeding, and Hierarchy

(A and C) Number of attacks counted during one hour after 3 weeks of various diets in CF (A, different shades of red) and in SF (C, different shades of blue), and expressed as a percentage of attack numbers in the normal diet condition.

(B and D) Slopes of the tangents of the cumulative curves at 10, 30, and 60 min corresponding to experimental conditions in (A) and (C), respectively, and allowing for comparison of the patterns of attacks (same color codes).

(E) HPLC measurement of 5HT in the dissected brains of SF identified as dominant (black) or subordinate (white) in a group.

groups (see next section). Briefly, raphe 5HT neurons are involved in the control of mood and anxiety in mammals, whereas the hypothalamus is a neuroendocrine brain region controlling homeostatic functions. Dominant SF had lower 5HT levels than subordinate SF in their posterior brain, whereas anterior brain 5HT levels were identical in dominant/subordinate fish and thus independent from the hierarchical order (Figure 5E). This demonstrates that the dominant SF in a school undergoes an experience-dependent downregulation of its raphe 5HT levels. Together with the data showing that aggressiveness and 5HT levels are inversely correlated, this suggests that the typical “up” pattern of SF in the intruder test corresponds to attacks for establishment of dominance.

Altogether, these experiments suggest that SF attacks correspond to a social behavior (hierarchical order), whereas CF attacks correspond to a feeding behavior (foraging).

### Comparing Cavefish and Surface Fish Serotonergic Systems

We next compared the neuroanatomical organization of the 5HT systems in SF and CF. Their overall organization of 5HT-positive neurons and fibers was similar to that described in other teleosts (Figures 6A and 6B; [34, 36]). The serotonergic neurons were located in the hindbrain raphe nucleus and in three hypothalamic nuclei corresponding to the anterior, intermediate, and posterior paraventricular nuclei (PVA*i/p*), which are located along the third ventricle and its lateral and posterior recesses, respectively (Figures 6A–6G'). The 5HT neuronal patterns in SF and CF juveniles were identical. However, at all stages examined (1 week to 1 month) the PVA nucleus was larger in CF (Figures 6C, 6D, and S4A), both in terms of A-P extension (+37%;  $p < 0.0001$ ) and surface area (Figure 6H), suggesting that the PVA contained more neurons in CF than in SF. Accordingly, the fiber tract emanating from the PVA was thicker in CF (Figures 6G and 6G'). This difference was specific to the PVA nucleus, because the PVp and the raphe were of comparable sizes in the two morphs (Figure 6H).

This neuroanatomical difference was confirmed by HPLC measurement of 5HT in the dissected anterior part (hypothalamic neurons) and posterior part (raphe neurons) of SF and CF brains. The serotonin content was 45% higher in the forebrain samples of CF, whereas the raphe samples were identical in the two morphs (Figure 6I). We thus attribute the difference between the hypothalamic samples of the two morphs to the larger PVA in CF. Moreover, we propose that

CF attacks, occurring early in the behavioral test and corresponding to foraging, are driven by their larger PVA nucleus and higher PVA 5HT content.

Finally, it is worth noting that the average raphe 5HT level of SF randomly chosen in a tank is identical to that of subordinate SF, but higher than that of dominant SF ( $p = 0.0047$ ; compare Figures 6I and 5E), consistent with a single fish being dominant in a school and with this fish undergoing a specific downregulation of 5HT content in its raphe nucleus.

### Earlier Serotonergic Neurogenesis in Cavefish

To investigate the developmental origin of the size difference of the PVA nucleus between the two morphs, we performed a time course analysis of the appearance of 5HT neurons in embryos. *Astyanax* embryos develop very fast (a swimming larva hatches at 25 hpf), and CF and SF development is totally synchronous [37]. The first hypothalamic 5HT neurons were detectable as early as 18 hpf in CF (Figures 7A and 7B), whereas their SF homologs are never seen before 22–23 hpf (Figures 7C–7F). These neurons correspond to the future PVA neurons because they extend thick processes with flat end-feet toward the ventricular surface, a typical CSF-contacting cell morphology that is distinctive of this neuronal group (Figures 7E, 7F, and S4B). Thus, the difference in number of PVA 5HT neurons between the two *Astyanax* morphs can be traced back to the onset of serotonergic neurogenesis, which starts earlier in CF.

Contrary to PVA neurons, raphe 5HT neurons are first detected at the same stage in SF and CF, at around 20–21 hpf (Figures 7C and 7D). The same holds true for other steps of 5HT differentiation, such as the growth of axons or the innervation of the casquette (data not shown and [38]). Therefore, the specific difference in the 5HT hypothalamic PVA nucleus between CF and SF originates early in embryonic development, at a stage when the neuroepithelium is proliferating and when forebrain patterning and morphogenesis are largely incomplete.

### Modifying 5HT Neurogenesis in Cavefish Modifies Their Behavior

Shh signaling is increased at the CF anterior midline during gastrulation/neurulation, indirectly causing the loss of eyes but also the formation of a larger hypothalamus [6, 10, 11]. To test whether precocious 5HT neurogenesis in the hypothalamus is influenced by stronger Shh signaling in CF, we treated CF embryos between 15 hpf and 24 hpf with cyclopamine, an



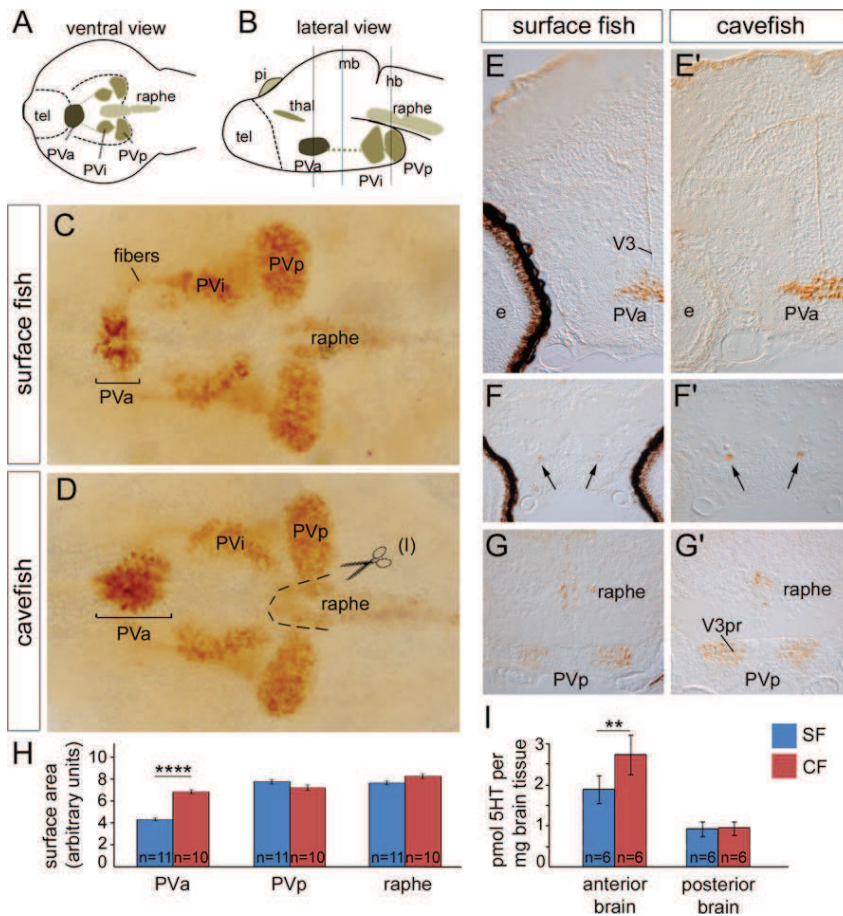


Figure 6. Comparative Anatomy of Serotonergic System in SF and CF

(A and B) Schemes showing the localization of 5HT neuronal cell bodies in the brain of *Astyanax mexicanus*, on a ventral (A) and a lateral (B) view. hb, hindbrain; mb, midbrain; pi, pineal gland; PVa, anterior paraventricular nucleus; PVi, intermediate paraventricular nucleus; PVp, posterior paraventricular nucleus; tel, telencephalon; thal, thalamus. Vertical lines in (B) indicate approximate section planes for panels (EE'), (FF'), and (GG'), respectively.

(C and D) Immunohistochemistry for 5HT on photomontages (because the different nuclei are not in the same focus) of in toto ventral views of dissected brains of 1-week-old SF (C) and CF (D). 5HT neuronal groups are indicated; compare to schemes (A) and (B). The dotted line/scissors in (D) indicate the dissection cut for HPLC measurements in (I) and in Figure 5E.

(E–G') Immunohistochemistry for 5HT on transverse sections from 1-week-old SF (left) and CF (right) heads. e, eye; V3 and V3pr, third ventricle and posterior recess. Arrows in (F) and (F') point to the fiber tract connecting Pva to posterior hypothalamus.

(H) Quantification of the size of 5HT neuronal groups in SF and CF. The surface area of the immunolabeled region was measured.

(I) HPLC measurement of 5HT in the anterior part and posterior part of the brain of SF (blue) and CF (red).

inhibitor of Shh signaling [39, 40], and analyzed their 5HT system at 55 hpf. Cyclopamine treatment caused a dose-dependent developmental perturbation and reduction of the hypothalamic width (Figures 7G and S5), demonstrating the efficiency of Shh signaling inhibition. The treatment also reduced the surface area of both the PVa and the raphe (Figure 7G and S5), consistent with an effect of Shh signaling all along the neural tube ventral midline. Because cyclopamine 10  $\mu$ M strongly diminished the survival of larvae, we chose 5  $\mu$ M to treat embryos between 15 hpf and 24 hpf, and these were grown to 3 months and tested for behavior. Cyclopamine-treated CF performed 2.5 times more attacks than their ethanol-treated controls (Figure 7H). They presented an attenuated “down” pattern, (Figure 7I). We propose the following interpretation: Cyclopamine-treated CF have a “down” (representing food-seeking) pattern because their PVa size is moderately reduced to 88% of the control CF value, and therefore they still search for food at the beginning of the test (the size of the SF PVa is only 63% the CF size). But the pattern is attenuated, due to more attacks in the second part of the test, because their raphe is smaller and contains less 5HT, mimicking the case of a dominant SF.

## Discussion

We used varied experimental approaches to characterize aggressive behavior in *Astyanax* and to investigate the origin of its loss in cavefish populations. We demonstrated a link between the early development of a neuronal network

and the possibly adaptive behaviors it controls. In addition, we deciphered the previously unknown functional roles of hypothalamic and hindbrain serotonergic neurons in a teleost. We propose that *Astyanax* raphe serotonergic neurons control social behavior, whereas hypothalamic serotonergic neurons control homeostatic functions.

## Behavioral Analysis: Combining Attack Numbers and Patterns

Previous studies have reported the loss of aggressive behavior in *Astyanax* blind populations [17, 18, 26]. But these authors focused on the number of attacks, which were counted during short periods of time (10–15 min). Here, we have used longer behavioral observations and combined information given by attack counts and attack patterns. By doing so, we inferred that a SF attack does not have the same meaning as a CF attack. We propose to discriminate between the “true” attacks performed by SF, which underlie social dominance, and the “false” attacks performed by CF, which actually correspond to food-seeking attempts.

In contrast to our present findings, the Molino population was previously reported as an aggressive cavefish population [18]. Espinasa and colleagues had counted the number of attacks during a 10 min window, 30 min after putting the two fish together. According to our pattern analysis, during this particular 10 min window, Pachón cavefish perform almost no attacks, due to their typical “down” pattern, whereas Molino cavefish do perform some attacks, because they show a “flat” pattern. The apparent discrepancy between the two studies is therefore explained.





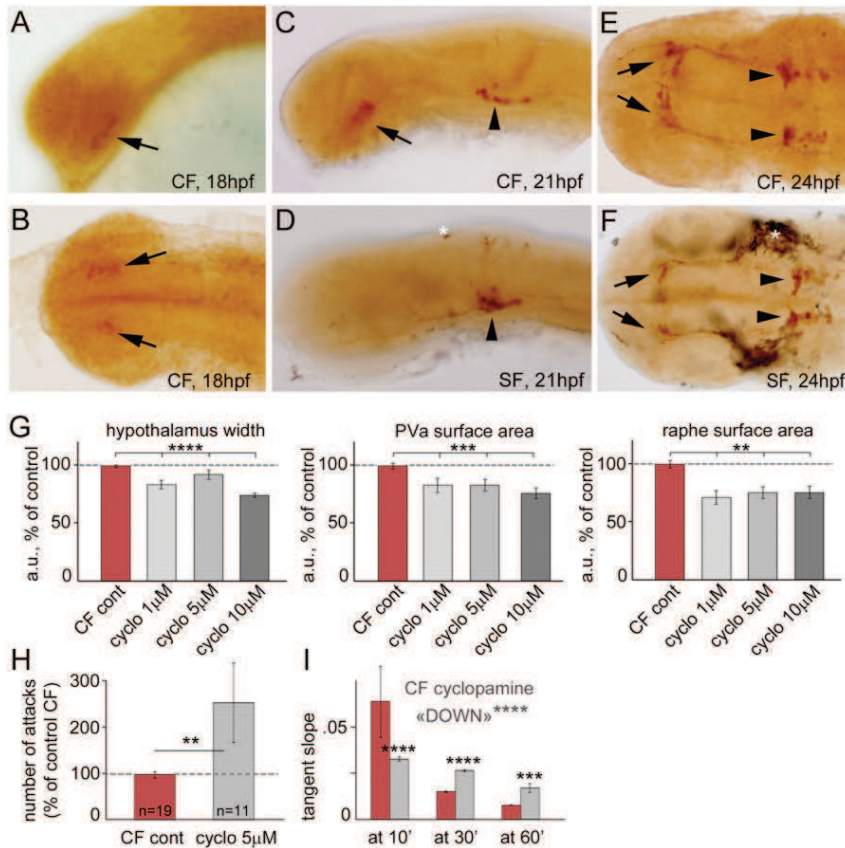


Figure 7. Developmental Evolution of the Serotonergic System in CF and Its Impact on Aggressiveness

(A–F) Immunohistochemistry for 5HT in toto on dissected embryonic brains at the indicated developmental stage. (A), (C), and (D) show lateral views, whereas (B), (E), and (F) show ventral views. Anterior is to the left. Arrows point to PVA neurons; arrowheads point to raphe neurons. Note that in SF at 21 hpf, raphe neurons but not PVA neurons are detected (D). White asterisks point to pigment cells in SF.

(G) Quantification of cyclopamine effect on the development of the hypothalamus (hypothalamus width, left) and 5HT neuronal nuclei (PVA nucleus, middle; raphe nucleus, right).

(H) Number of attacks counted during 1 hr in CF that had been treated with 5  $\mu$ M cyclopamine between 15 hpf and 24 hpf (gray), expressed as a percentage of attack number in controls (red). (I) Slopes of the tangents of the cumulative curves at 10, 30, and 60 min corresponding to experimental conditions, respectively, and allowing for comparison of the patterns of attacks (same color codes as in H).

### Vision Is Dispensable to Expressing Aggressive Behavior

Triggers for SF aggressive behavior were initially thought to be visual because aggression was reduced in the dark under certain conditions—although it was noted that “the attacks could be vehement in darkness, too” [17]. This view was first challenged after reporting that SF with degenerated eyes after embryonic lens extirpation presented intense aggressive behavior [18]. Here, with a larger experimental sample, we ascertained this tendency and were further able to study the aggressive pattern of these blinded animals, which is typical of a SF type. Moreover, with our protocol and contrarily to the findings of Burchard et al. [17], there was no reduction in SF aggressiveness in the dark. This is probably because our set-up, in a small volume of water, corresponds to a test of territoriality: in *Astyanax*, there is an opposite behavioral “gradient” of territoriality versus schooling, as a function of available space for a group of fish [17]. We show that, even in the dark, dominance aggressiveness is present in SF, a result that is strengthened by the conservation of the “up” pattern in this condition. The data from blinded SF and from SF in the dark are thus consistent with dominance aggressiveness not necessitating visual stimulation. The lateral line appears like a candidate sensory system to mediate this stimulation, a hypothesis that should be tested in the future.

### Functional Insights from Comparative Analysis of Behavior and Anatomy

We used CF as “natural mutants” and compared them to SF to study developmental evolution of the brain and the behaviors it governs in an adaptive context. Whereas the

involvement of raphe neurons in aggressiveness and social behavior in mammals has long been reported [41], the respective functions of the raphe and hypothalamic serotonergic neurons in teleosts (the latter neurons do not exist in mammals) were previously unknown [42].

Concerning SF, the social nature of attacks is probably linked to the fact that these animals school. Even blinded SF tend to swim close to each other, and this is associated to an “up” pattern in the intruder test. These social-dominance-related attacks are controlled by the raphe, and aggressiveness is inversely correlated to raphe 5HT content. Indeed, when SF raphe 5HT levels are increased (pharmacologically) or decreased (in dominants), hierarchical attacks vary in an opposite manner. Even in CF, when the number of 5HT raphe neurons is experimentally reduced (cyclopamine), it seems possible to induce a small component of dominance-related aggressiveness. Across phyla, serotonin plays a significant role in dominance behavior [43–48]. Whether dominance is a cause or a consequence of the change in raphe 5HT neurotransmission and the mechanisms leading to these biochemical and behavioral changes is unclear. In mammals, the activity of raphe neurons is increased [49] and the expression of 5HT<sub>1A</sub> receptors is decreased [50] in subordinate individuals, and knock-out mice for the 5HT transporter are inferior in obtaining the dominant position [51]. Consistently in *Astyanax*, we found a decrease in raphe 5HT and 5HIAA content in dominant SF. Whatever the mechanism for decreasing the activity of raphe serotonergic neurons in socially dominant individuals, this regulation seems shared among vertebrates. In the fighting fish [27, 52] and other fish [53], in rodents and primates including humans [41], correlations between 5HT neurotransmission and social aggressiveness are described, including polymorphisms in the MAO<sub>A</sub> promoter described in humans with antagonistic behavior [54, 55].

In contrast to SF, blind CF do not school [35], although they probably possess the navigational abilities to do so. The



“foraging” nature of their behavior in the intruder test is supported by the finding that overfed CF attack less than controls. However, overfed CF keep their “down” pattern, demonstrating that they do not try to establish hierarchy even in a high energy state. A possibility is that they cannot downregulate their raphe 5HT levels. Alternatively, they may not use this regulation, because dominance behavior is tightly associated to social interactions. Only when their raphe nucleus is developmentally modified (by cyclopamine) do they perform a few dominance-like attacks. Further experiments will need to investigate whether 5HT neurotransmission in the PVa directly controls foraging behavior, or whether it does so by controlling the activity of nearby hypothalamic neurons containing neuropeptides such as NPY or POMC, which are master regulators of feeding behavior in all vertebrates [56, 57].

#### An Adaptive Value for Losing Aggressive Behavior in Cavefish?

The adaptive nature of the loss of aggressiveness in CF is not evident. One hypothesis was that CF populations in their natural habitat are small, decreasing the chances for two individuals to meet and reducing the stabilizing selection for agonistic behavior [17].

We propose that the loss of aggressiveness in cavefish is a “side effect” of the loss of schooling behavior, itself not selected in caves because predators are absent and because it is deleterious for efficient food finding in the dark. Moreover, 5HT network modifications control a behavioral gain for foraging, due to developmental evolution of their hypothalamic 5HT neurons. Apart from the reasoning that feeding in the dark is a major challenge for cavefish, several lines of evidence may suggest an adaptive nature for this behavioral shift.

- (1) When an organism is hungry, a probably frequent situation in caves, it employs behaviors to locate and ingest food while suppressing other behaviors. Insulin signaling coordinates behavioral output with changes in metabolism, NPY activates behaviors required for ingesting food, and serotonin modulates behaviors performed when an organism is satiated [58]. The hypothalamic modification observed in CF suggests that the selection pressure acted on the development of the 5HT system.
- (2) In food competition experiments in the dark, CF have a food-finding ability that is four times higher than SF, and in the wild SF incidentally washed into caves starve because they cannot compete with cavefish [16]. Thus, CF persistent food-seeking behavior increases survival in the dark.
- (3) Aggression has been repeatedly lost in independently evolved natural cavefish populations (Pachón, Molino, Micos; see this work and [17, 18]). It will be important to analyze the 5HT system in several cavefish populations to assess whether the loss of aggressiveness/gain of foraging can be attributed to parallelism or to convergence, but it remains that this repeated evolution suggests that the behavioral change is advantageous. The results from CFxSF hybrids suggest that the trait is complex. The results from the Pachón x Molino cross suggest that the same gene(s) are involved in these two cave populations, although their different patterns of attacks suggest that partly different genes might be involved.

- (4) CF underwent a loss of related collective behaviors (schooling, dominance). Because they navigate mainly with their lateral line sensory inputs, which also help them to locate food [9], isolated swimming probably provides them with a higher signal/noise ratio to their neuromasts, increasing their chances to find food. These chances are also increased by their continuous exploration of the environment, both as larvae [38] and as adults (Figure S3), and by their loss of sleep [15].

#### Midline-Induced Developmental Evolution in Cavefish?

Previous studies suggested a developmental modification of the ventral forebrain in CF compared to SF, due to changes in signaling centers secreting Shh and Fgf8 during embryogenesis [6, 10]. Here, we describe a developmental heterochrony of the appearance of the hypothalamic 5HT neurons in cavefish, potentially causing a longer period of 5HT neurogenesis and resulting in a larger size of the PVa nucleus. Conversely, the development of hindbrain raphe neurons is synchronous in the two morphs, and their mature raphe is of similar size. Whereas the roles of Shh and Fgf8 in the specification of mammalian raphe neurons is known [59–61], their roles in the specification of 5HT neurons in fish are unknown [42]. Our cyclopamine experiments show that fish raphe neurons develop in a conserved, Shh-dependent manner and demonstrate that fish hypothalamic 5HT neurogenesis is also controlled by Shh signaling.

Pet-1, an Ets-family transcription factor, is together with Lmx1b and Nkx2.2 a major player in the specification and differentiation of raphe neurons [59–61]. However, fish hypothalamic neurons do not express Pet-1 ([62]; H.H. and S.R., unpublished data, for *Astyanax*), suggesting that there are alternative developmental pathways to generate 5HT neurons in the diencephalon. Together with cyclopamine experiments, the fact that cavefish, with their increased Shh signaling in the embryonic hypothalamus [10], possess more 5HT neurons in the PVa suggests that Shh controls the yet unknown gene regulatory network leading to 5HT specification in the hypothalamus. Finally, the behavior of the Molino cavefish population (few attacks and “flat” pattern, interpreted as persistent foraging behavior) predicts that these animals will have an even larger PVa nucleus. Obtaining embryos from this population will be key to checking this prediction.

Using cavefish, we have unmasked a novel pleiotropic developmental effect of the modulation of embryonic signaling centers. In line with the hypothesis of the importance of selection on constructive traits and the indirect effects on regressive traits through mutations in pleiotropic developmental genes [5, 63], Shh hypersignaling in CF leads to eye loss, and also to an increased oral (jaws and teeth) and sensory (taste buds) apparatus, as well as to subtle modifications in forebrain neuronal circuits, which have constructive behavioral consequences.

#### Experimental Procedures

##### Aggressive Behavior

Aggressive behavior was measured on ~3-month-old (minimum size: 1.5 cm) fish in a room at 25°C in lighted conditions. All fish were tested once. There was no sex difference in the behavior. Fish were isolated overnight in plastic boxes (12 × 9 × 5 cm) containing 200 ml of water (2 liters for adults). The next morning, “intruders” were transferred into the box of “resident” fish, and their interactions were recorded during 1 hr using a webcam (Logitech Quick Cam Pro9000). The two fish were always of the same population/treatment and similar size. Movies were analyzed manually using the



ODRec software (Observational Data Recorder, a gift from Samuel Péan, IFREMER, La Rochelle, France). An attack was defined as the charge of a fish and the escape of the other. In figures, the *n* numbers given in bars indicate the number of tests (hence the number of animals used is 2 *n*).

For experiments in darkness, fish were conditioned and tested in continuous darkness, using an infrared light table (Viewpoint) and a Dragonfly2 camera (Point Grey).

To analyze patterns of attacks, we used cumulative counts of attacks (clouds of points), expressed as a percentage of the total number of attacks in each test. Therefore, the maximum value of each cumulative cloud of points is 100%. The normalized attack frequency at a given time point thus corresponds to the slope of the tangent to the curve at this point. To determine the tangent function mathematically, we found the best fit to the cloud of point through regressions using Graph. We chose the best correlation coefficient ( $R^2$ ) between linear, logarithmic, exponential power, and polynomial of order 2 regressions. The slopes of tangents at 10, 30, and 60 min of each test were calculated and used to compare the patterns (Figure S1B).

#### Statistical Analyses

The distribution of the data was not normal, even in cases of large samples (Chi<sup>2</sup> or Shapiro-Wilk coupled to Kolmogorov-Smirnov). Therefore data were analyzed through nonparametric tests, using Statview. Mann-Whitney was used to compare samples two by two, and Kruskal-Wallis was used to compare more than two samples, dose responses, and aggressive patterns. Mann-Whitney was used after Kruskal-Wallis. Values are mean  $\pm$  SEM. Significance was set at  $p < 0.05$  (\*), \*\*, \*\*\*, and \*\*\*\* correspond to  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , and  $p < 0.0001$ , respectively.

Other methods are described in Supplemental Experimental Procedures.

#### Supplemental Information

Supplemental Information includes five figures, Supplemental Experimental Procedures, and three movies and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.044>.

#### Acknowledgments

This work was supported by an ANR grant (ASTYCO) to S.R. We thank Laurent Legendre for help in obtaining hybrids and for observations of dominant behavior, Samuel Péan for the ODRec software, Stéphane Père and Magalie Bouvet for care of our *Astyanax* colony, Jonathan Bibliowicz for proofreading English, and all group members for insightful discussions.

Received: July 18, 2012

Revised: September 27, 2012

Accepted: October 24, 2012

Published: November 15, 2012

#### References

- Jeffery, W.R. (2001). Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. *Dev. Biol.* 231, 1–12.
- Jeffery, W.R. (2009). Chapter 8. Evolution and development in the cavefish *Astyanax*. *Curr. Top. Dev. Biol.* 86, 191–221.
- Darwin, C. (1859). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*, Chapter V (London: John Murray), p. 137.
- Wilkens, H. (1988). Evolution and genetics of epigeal and cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). Support for the neutral mutation theory. In *Evolutionary Biology*, Volume 23, M.K. Hecht and B. Wallace, eds. (New York: Plenum), pp. 271–367.
- Jeffery, W.R. (2010). Pleiotropy and eye degeneration in cavefish. *Heredity* (Edinb) 105, 495–496.
- Menuet, A., Alunni, A., Joly, J.S., Jeffery, W.R., and Rétaux, S. (2007). Expanded expression of Sonic Hedgehog in *Astyanax* cavefish: multiple consequences on forebrain development and evolution. *Development* 134, 845–855.
- Yamamoto, Y., Byerly, M.S., Jackman, W.R., and Jeffery, W.R. (2009). Pleiotropic functions of embryonic sonic hedgehog expression link jaw and taste bud amplification with eye loss during cavefish evolution. *Dev. Biol.* 330, 200–211.
- Jeffery, W., Strickler, A., Guiney, S., Heyser, D., and Tomarev, S. (2000). Prox 1 in eye degeneration and sensory organ compensation during development and evolution of the cavefish *Astyanax*. *Dev. Genes Evol.* 210, 223–230.
- Yoshizawa, M., Goricki, S., Soares, D., and Jeffery, W.R. (2010). Evolution of a behavioral shift mediated by superficial neuromasts helps cavefish find food in darkness. *Curr. Biol.* 20, 1631–1636.
- Pottin, K., Hinaux, H., and Rétaux, S. (2011). Restoring eye size in *Astyanax mexicanus* blind cavefish embryos through modulation of the Shh and Fgf8 forebrain organising centres. *Development* 138, 2467–2476.
- Yamamoto, Y., Stock, D.W., and Jeffery, W.R. (2004). Hedgehog signaling controls eye degeneration in blind cavefish. *Nature* 431, 844–847.
- Sharma, S., Coombs, S., Patton, P., and Burt de Perera, T. (2009). The function of wall-following behaviors in the Mexican blind cavefish and a sighted relative, the Mexican tetra (*Astyanax*). *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* 195, 225–240.
- Windsor, S.P., Norris, S.E., Cameron, S.M., Mallinson, G.D., and Montgomery, J.C. (2010). The flow fields involved in hydrodynamic imaging by blind Mexican cave fish (*Astyanax fasciatus*). Part II: gliding parallel to a wall. *J. Exp. Biol.* 213, 3832–3842.
- Windsor, S.P., Tan, D., and Montgomery, J.C. (2008). Swimming kinematics and hydrodynamic imaging in the blind Mexican cave fish (*Astyanax fasciatus*). *J. Exp. Biol.* 211, 2950–2959.
- Duboué, E.R., Keene, A.C., and Borowsky, R.L. (2011). Evolutionary convergence on sleep loss in cavefish populations. *Curr. Biol.* 21, 671–676.
- Hüppop, K. (1987). Food-finding ability in cave fish (*Astyanax fasciatus*). *Int. J. Speleol.* 16, 59–66.
- Burchards, H., Dölle, A., and Parzefall, J. (1985). Aggressive behavior of an epigeal population of *Astyanax mexicanus* and some observations on three subterranean populations. *Behav. Processes* 11, 225–235.
- Espinasa, L., Yamamoto, Y., and Jeffery, W.R. (2005). Non-optical releasers for aggressive behavior in blind and blinded *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Behav. Processes* 70, 144–148.
- Langecker, T.G., Neumann, B., Hausberg, C., and Parzefall, J. (1995). Evolution of the optical releasers for aggressive behavior in cave-dwelling *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). *Behav. Processes* 34, 161–167.
- Alunni, A., Menuet, A., Candal, E., Pénigault, J.B., Jeffery, W.R., and Rétaux, S. (2007). Developmental mechanisms for retinal degeneration in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *J. Comp. Neurol.* 505, 221–233.
- Yamamoto, Y., and Jeffery, W.R. (2000). Central role for the lens in cave fish eye degeneration. *Science* 289, 631–633.
- Soares, D., Yamamoto, Y., Strickler, A.G., and Jeffery, W.R. (2004). The lens has a specific influence on optic nerve and tectum development in the blind cavefish *Astyanax*. *Dev. Neurosci.* 26, 308–317.
- Elmer, K.R., and Meyer, A. (2011). Adaptation in the age of ecological genomics: insights from parallelism and convergence. *Trends Ecol. Evol.* 26, 298–306.
- Bradic, M., Beerli, P., García-de León, F.J., Esquivel-Bobadilla, S., and Borowsky, R.L. (2012). Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex (*Astyanax mexicanus*). *BMC Evol. Biol.* 12, 9.
- Strecker, U., Faúndez, V.H., and Wilkens, H. (2004). Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 33, 469–481.
- Parzefall, J. (1985). On the heredity of behavior patterns in cave animals and their epigeal relatives. *Bulletin of the National Speleological Society* 47, 128–135.
- Clotfelter, E.D., O'Hare, E.P., McNitt, M.M., Carpenter, R.E., and Summers, C.H. (2007). Serotonin decreases aggression via 5-HT1A receptors in the fighting fish *Betta splendens*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 87, 222–231.
- Craig, I.W., and Halton, K.E. (2009). Genetics of human aggressive behaviour. *Hum. Genet.* 126, 101–113.
- Popova, N.K. (2008). From gene to aggressive behavior: the role of brain serotonin. *Neurosci. Behav. Physiol.* 38, 471–475.
- Winberg, S., Øverli, O., and Lepage, O. (2001). Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary L-tryptophan. *J. Exp. Biol.* 204, 3867–3876.
- Wong, D.T., Bymaster, F.P., and Engleman, E.A. (1995). Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an



- antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sci.* 57, 411–441.
32. Braestrup, C., Andersen, H., and Randrup, A. (1975). The monoamine oxidase B inhibitor deprenyl potentiates phenylethylamine behaviour in rats without inhibition of catecholamine metabolite formation. *Eur. J. Pharmacol.* 34, 181–187.
  33. Anichtchik, O., Sallinen, V., Peitsaro, N., and Panula, P. (2006). Distinct structure and activity of monoamine oxidase in the brain of zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol.* 498, 593–610.
  34. Sallinen, V., Sundvik, M., Reeniä, I., Peitsaro, N., Khrustal'ov, D., Anichtchik, O., Toleikyte, G., Kaslin, J., and Panula, P. (2009). Hyperserotonergic phenotype after monoamine oxidase inhibition in larval zebrafish. *J. Neurochem.* 109, 403–415.
  35. Parzefall, J., and Senkel, S. (1986). Schooling behavior in cavernicolous fish and their epigeal conspecifics. *Cong. Int. Espeleol.* 2, 107–109.
  36. Ekström, P., and Van Veen, T. (1984). Distribution of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in the brain of the teleost *Gasterosteus aculeatus* L. *J. Comp. Neurol.* 226, 307–320.
  37. Hinaux, H., Pottin, K., Chalhoub, H., Pèrè, S., Elipot, Y., Legendre, L., and Rétaux, S. (2011). A developmental staging table for *Astyanax mexicanus* surface fish and *Pachón* cavefish. *Zebrafish* 8, 155–165.
  38. Pottin, K., Hyacinthe, C., and Rétaux, S. (2010). Conservation, development, and function of a cement gland-like structure in the fish *Astyanax mexicanus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 17256–17261.
  39. Chen, J.K., Taipale, J., Cooper, M.K., and Beachy, P.A. (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev.* 16, 2743–2748.
  40. Incardona, J.P., Gaffield, W., Kapur, R.P., and Roelink, H. (1998). The teratogenic *Veratrum* alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* 125, 3553–3562.
  41. Takahashi, A., Quadros, I.M., de Almeida, R.M., and Miczek, K.A. (2012). Behavioral and pharmacogenetics of aggressive behavior. In *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, J.F. Cryan and A. Reif, eds. (Heidelberg, Germany: Springer), pp. 73–138.
  42. Lillesaar, C. (2011). The serotonergic system in fish. *J. Chem. Neuroanat.* 41, 294–308.
  43. Edwards, D.H., and Spitzer, N. (2006). 6. Social dominance and serotonin receptor genes in crayfish. *Curr. Top. Dev. Biol.* 74, 177–199.
  44. Fairbanks, L.A., Jorgensen, M.J., Huff, A., Blau, K., Hung, Y.Y., and Mann, J.J. (2004). Adolescent impulsivity predicts adult dominance attainment in male vervet monkeys. *Am. J. Primatol.* 64, 1–17.
  45. Filby, A.L., Paull, G.C., Hickmore, T.F., and Tyler, C.R. (2010). Unravelling the neurophysiological basis of aggression in a fish model. *BMC Genomics* 11, 498.
  46. Korzan, W.J., and Summers, C.H. (2004). Serotonergic response to social stress and artificial social sign stimuli during paired interactions between male *Anolis carolinensis*. *Neuroscience* 123, 835–845.
  47. Popova, N.K., Naumenko, V.S., Plyusnina, I.Z., and Kulikov, A.V. (2005). Reduction in 5-HT<sub>1A</sub> receptor density, 5-HT<sub>1A</sub> mRNA expression, and functional correlates for 5-HT<sub>1A</sub> receptors in genetically defined aggressive rats. *J. Neurosci. Res.* 80, 286–292.
  48. Larson, E.T., and Summers, C.H. (2001). Serotonin reverses dominant social status. *Behav. Brain Res.* 121, 95–102.
  49. Paul, E.D., Hale, M.W., Lukkes, J.L., Valentine, M.J., Sarchet, D.M., and Lowry, C.A. (2011). Repeated social defeat increases reactive emotional coping behavior and alters functional responses in serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Physiol. Behav.* 104, 272–282.
  50. Cooper, M.A., Grober, M.S., Nicholas, C.R., and Huhman, K.L. (2009). Aggressive encounters alter the activation of serotonergic neurons and the expression of 5-HT<sub>1A</sub> mRNA in the hamster dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 161, 680–690.
  51. Lewejohann, L., Kloke, V., Heimig, R.S., Jansen, F., Kaiser, S., Schmitt, A., Lesch, K.P., and Sachser, N. (2010). Social status and day-to-day behaviour of male serotonin transporter knockout mice. *Behav. Brain Res.* 211, 220–228.
  52. Lynn, S.E., Egar, J.M., Walker, B.G., Sperry, T.S., and Ramenofsky, M. (2007). Fish on Prozac: a simple, noninvasive physiology laboratory investigating the mechanisms of aggressive behavior in *Betta splendens*. *Adv. Physiol. Educ.* 31, 358–363.
  53. Perreault, H.A., Semsar, K., and Godwin, J. (2003). Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish. *Physiol. Behav.* 79, 719–724.
  54. Manuck, S.B., Flory, J.D., Ferrell, R.E., Mann, J.J., and Muldoon, M.F. (2000). A regulatory polymorphism of the monoamine oxidase-A gene may be associated with variability in aggression, impulsivity, and central nervous system serotonergic responsivity. *Psychiatry Res.* 95, 9–23.
  55. Manuck, S.B., Flory, J.D., Muldoon, M.F., and Ferrell, R.E. (2002). Central nervous system serotonergic responsivity and aggressive disposition in men. *Physiol. Behav.* 77, 705–709.
  56. Meister, B. (2007). Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol. Behav.* 92, 263–271.
  57. Valassi, E., Scacchi, M., and Cavagnini, F. (2008). Neuroendocrine control of food intake. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 18, 158–168.
  58. Gruninger, T.R., LeBoeuf, B., Liu, Y., and Garcia, L.R. (2007). Molecular signaling involved in regulating feeding and other motivated behaviors. *Mol. Neurobiol.* 35, 1–20.
  59. Alenina, N., Bashammakh, S., and Bader, M. (2006). Specification and differentiation of serotonergic neurons. *Stem Cell Rev.* 2, 5–10.
  60. Deneris, E.S., and Wyler, S.C. (2012). Serotonergic transcriptional networks and potential importance to mental health. *Nat. Neurosci.* 15, 519–527.
  61. Kiyasova, V., and Gaspar, P. (2011). Development of raphe serotonin neurons from specification to guidance. *Eur. J. Neurosci.* 34, 1553–1562.
  62. Lillesaar, C., Tannhäuser, B., Stigloher, C., Kremmer, E., and Bally-Cuif, L. (2007). The serotonergic phenotype is acquired by converging genetic mechanisms within the zebrafish central nervous system. *Dev. Dyn.* 236, 1072–1084.
  63. Jeffery, W.R. (2005). Adaptive evolution of eye degeneration in the Mexican blind cavefish. *J. Hered.* 96, 185–196.



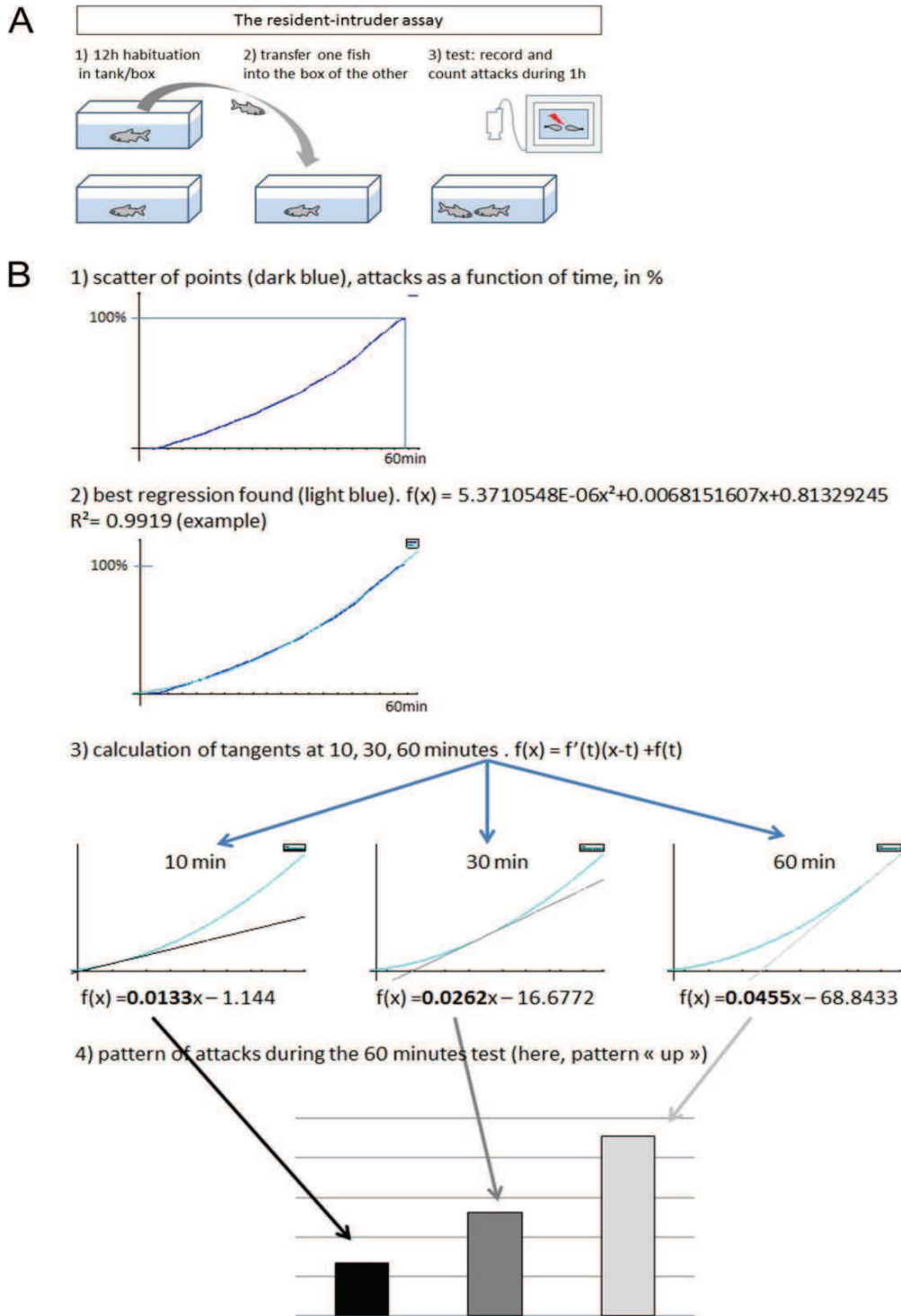


**Current Biology, Volume 23**  
**Supplemental Information**

**Evolutionary Shift from Fighting  
to Foraging in Blind Cavefish  
through Changes in the Serotonin Network**

**Yannick Elipot, Hélène Hinaux, Jacques Callebert, and Sylvie Rétaux**



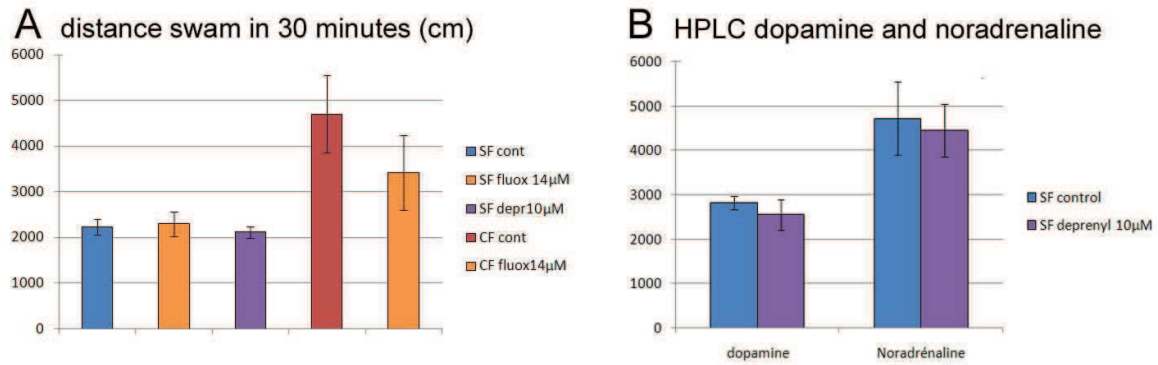


**Figure S1 (Related to Figure 1 and Experimental Procedures)**

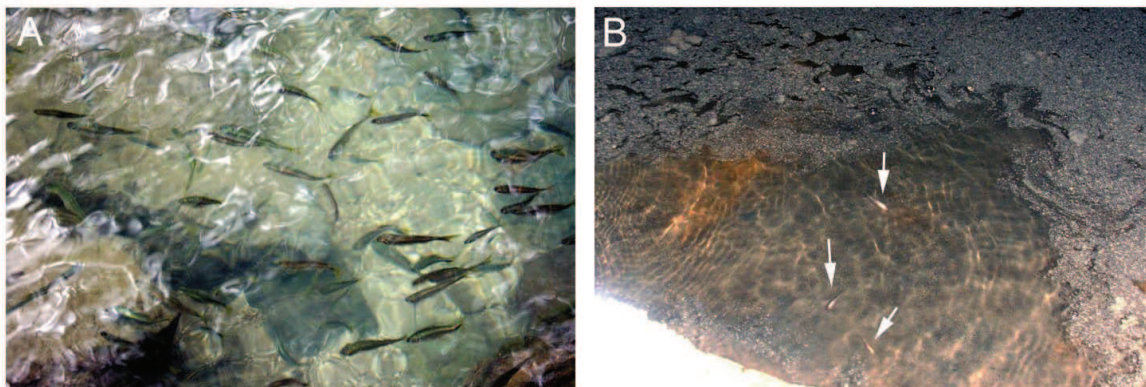
(A) Schema of the resident-intruder assay protocol to measure aggressive behavior in *Astyanax*.

(B) Method used for analysis of the pattern of attacks, illustrated here step by step for a surface fish individual.



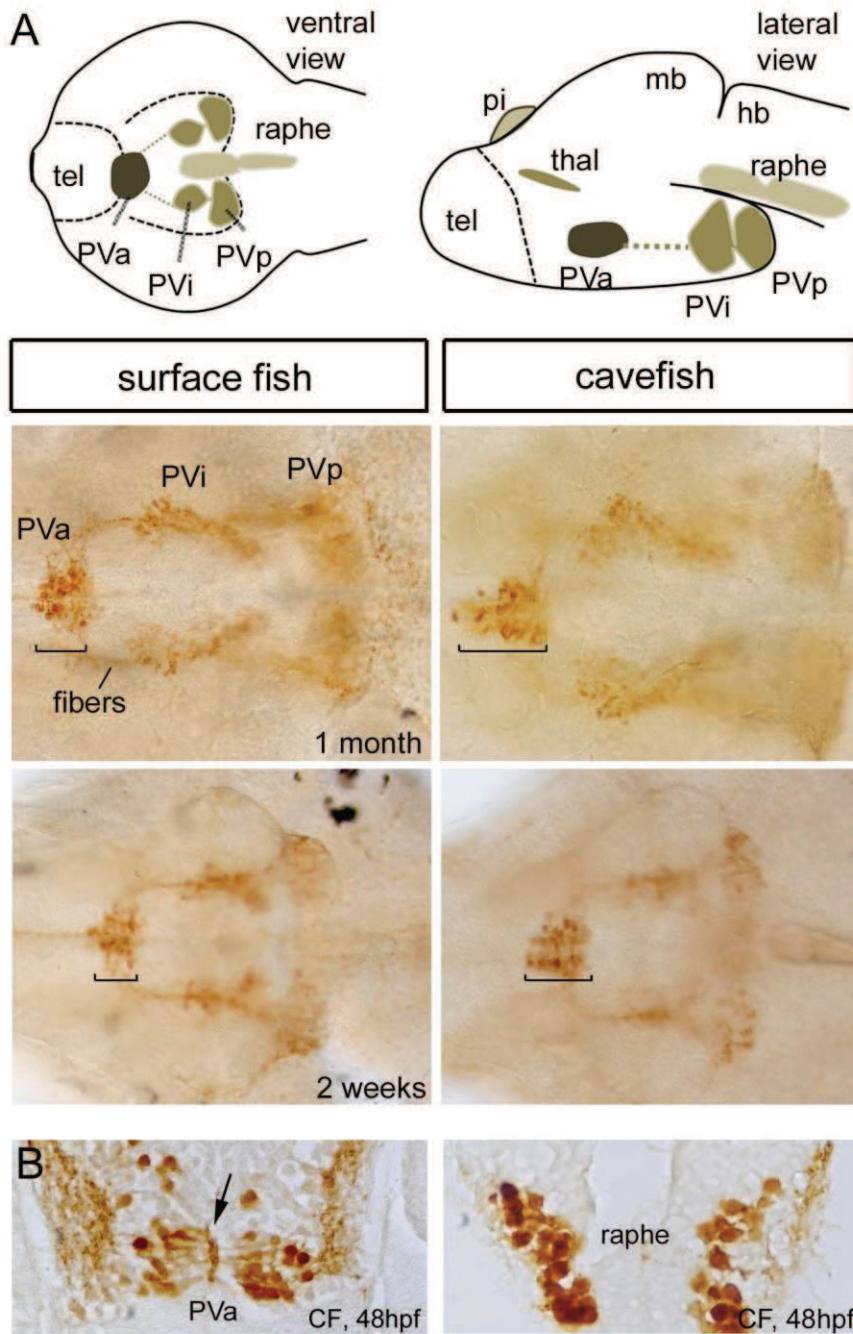


**Figure S2 (Related to Figure 4). Controls for the Effect of Fluoxetine and Deprenyl**  
**(A)** distance swam during a 30 minutes period, calculated in centimeters after tracking pharmacologically-treated individual fish. Color code indicated.  
**(B)** HPLC measurement of dopamine and noradrenaline in control and deprenyl-treated SF. The compound has a specific effect on serotonin level, but does not affect other amines.



**Figure S3 (Related to Figure 5 and Discussion). Schooling Behavior in the Wild**  
 Schooling behavior in SF (A) but not in CF (B). The picture in (A) was taken in the Nacimiento del Río Choy, on the East side of the Sierra del Abra and shows shoaling/schooling surface fish. The picture in (B) was taken in the Pachòn cave, and shows isolated swim (arrows) for cavefish.





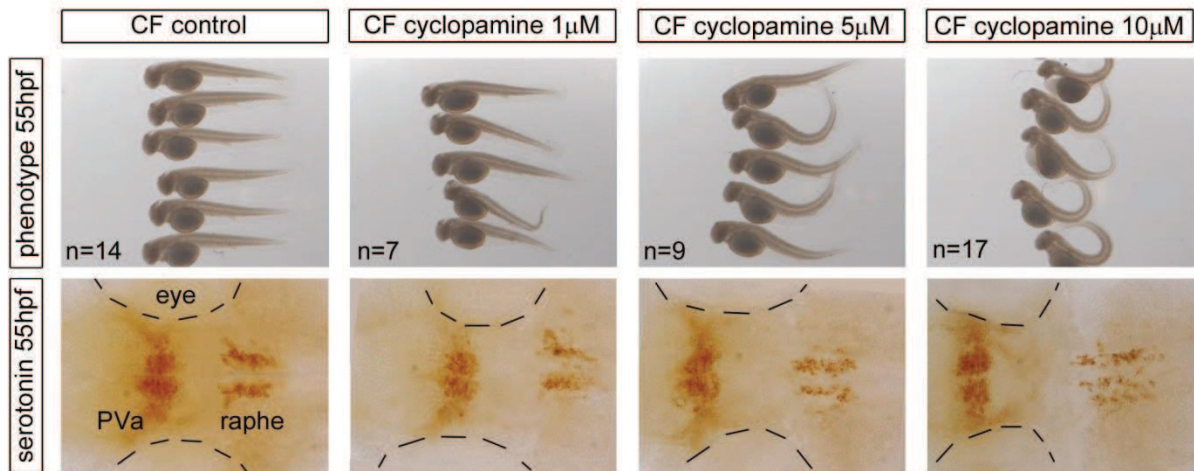
**Figure S4 (Related to Figure 6).**

**(A)** Comparative anatomy of the hypothalamic 5HT system 2 weeks-old and one month-old CF and SF. Top: schematics of the 5HT system in *Astyanax*, same as Figure 6. Bottom: photographs in ventral views of dissected brains at the indicated age, after 5HT immunostaining. The brackets point to the larger size of the PVa nucleus in cavefish.

**(B)** Sections through the PVa nucleus and the raphe nucleus of 48hpf CF larvae, showing the typical CSF-contacting morphology of PVa neurons, with thick processes contacting the ventricle.







**Figure S5 (Related to Figure 7). Controls for the Effect of Cyclopamine Treatments**

Effect of cyclopamine treatments (incubation from 15hpf to 24hpf) on the general morphology of larvae at 55hpf (first line) and on the 5HT neurotransmitter system development (second line), viewed at 55hpf after anti-serotonin immunohistochemistry.



## Supplemental Experimental Procedures

### Animals

Laboratory stocks of *A. mexicanus* SF and CF (Pachòn and Molino populations) were obtained in 2004-2006 from the Jeffery laboratory at the University of Maryland, College Park, MD, and were since then bred in our local facility. Fish were maintained at 23-26°C on 12:12 hours light: dark cycle and they were fed twice a day with dry and living food. The fry were raised in Petri dishes and fed with two days-old artemia.

### Additional Behavioral Analyses: Locomotion and Vision

**Locomotion** was estimated by the distance swam during half an hour. Three months old fish were isolated in Lab3 boxes overnight in 200mL of water at 25°C. The next morning, a 45 minutes movie was recorded. The first 15 minutes were deleted to eliminate possible disruption due to the entry of the experimenter in the room and tracking of the locomotor behavior was done using Viewpoint software (Amatrace platform, Gif sur Yvette) and Virtual dub (plug-in adapted by Yves Lhuillier).

**Vision** of lens-ablated SF was checked using a fear test. The fish were isolated for a night in Lab3 boxes containing 200mL water at 25°C. A black disk was moved above boxes (mimicking a predator) and the reaction of the fish was recorded (Movie S3). The fish showing an escape response were considered as sighted and were not used in the resident-intruder test (note that in these conditions, control SF but not CF show an immediate escape response).

### Lens Ablation on Larvae

Lens ablations were performed as described by Yamamoto [1]. 30hpf larvae were placed in a drop of 5% low melting agarose (BioRad) containing 0.02 mg/ml Tricaine (MS222, Sigma Aldrich). Lenses were removed mechanically using ultrafine insect pins.

### Pharmacological Treatments

We used fluoxetine hydrochloride and R-deprenyl hydrochloride (Sigma Aldrich) dissolved in tank water. Both compounds were added 5 hours before the sacrifice of the animals (in case of biochemical assay) or before the test and were continuously present during the test (in case of behavioral assay).

Embryos were incubated in cyclopamine (LC-Laboratories C8700) in glass wells at 23°C. Dilutions were made from a 50mM stock dissolved in absolute ethanol. Embryos were incubated in glass dishes in cyclopamine from 15hpf (i.e., after gastrulation, neurulation and axis formation, but 3 hours before the appearance of the first 5HT neurons in CF) to 24hpf (i.e., slightly after the appearance of 5HT neurons in SF). Treated embryos were rinsed three times and then kept in a large volume of water.

### HPLC

HPLC assays were performed on fresh tissue. Animals were euthanized in an ice bath, weighed, measured, and sexed. Brains were rapidly dissected out on ice and cut in two parts at the level of the midbrain/hindbrain junction. Samples were immersed in hydrochloric acid ( $10^{-3}$ M), weighed, and frozen at -80°C. Brains were then crushed and filtered on a 10kDa membrane by centrifugation. The levels of serotonin and 5-HIAA were measured on acid HPLC columns as previously described [2].



### **Immunohistochemistry Anti-Serotonin**

Samples were fixed in PFA (paraformaldehyde 4% in PBS), gradually dehydrated in methanol and stored at -20°C. Permeabilization was achieved in PBS with 1% DMSO and 0.5% Triton, followed by incubation in a rat anti-serotonin primary antibody (Chemicon MAB 352, 1/200) and a secondary biotinylated goat anti-rat antibody (Jackson 112-066-072, 1/500). Revelation was performed using an avidin/biotin complex coupled with peroxidase (ABC kit, Universal Vectastain Kit PK6200) and diaminobenzidine (DAB, Sigma Aldrich). Embryos and/or brains were dissected out, mounted in glycerol, and photographs were taken on a Nikon E800 microscope equipped with a DXM1200 camera. Quantifications of brain areas were done with ImageJ. Alternatively, 8µm thick serial paraffin sections were cut and the number of sections containing the paraventricular nucleus was counted.

### **Supplemental References**

1. Yamamoto, Y., and Jeffery, W.R. (2002). Probing teleost eye development by lens transplantation. *Methods* 28, 420-426.
2. Kema, I.P., Schellings, A.M., Hoppenbrouwers, C.J., Rutgers, H.M., de Vries, E.G., and Muskiet, F.A. (1993). High performance liquid chromatographic profiling of tryptophan and related indoles in body fluids and tissues of carcinoid patients. *Clin. Chim. Acta* 221, 143–158.



## **Feed or fight: A behavioral shift in blind cavefish**

Publication N°2 publiée dans le journal

**Communicative and Integrative Biology**





## Feed or fight

### A behavioral shift in blind cavefish

Sylvie Rétaux\* and Yannick Elipot

Equipe Développement Evolution du Cerveau Antérieur; UPR3294 NeD; CNRS; Institut Alfred Fessard; Gif-sur-Yvette, France

**W**ithin the species *Astyanax mexicanus*, there are several inter-fertile populations of river-dwelling sighted fish and cave-dwelling blind fish which have evolved morphological and behavioral adaptations. We have recently reported a developmental and neurophysiological basis for the loss of aggressive behavior in the blind cavefish morph of *Astyanax*. Using an appropriate behavioral assay, we have shown that surface *Astyanax* show intense dominance-related aggressiveness. The expression of this behavior is inversely correlated with the serotonin (5HT) levels in their hindbrain raphe nucleus. Moreover this behavior is not solely visually-evoked and has a genetic component. Conversely in cavefish, there is no raphe-driven dominance aggressiveness. Instead, the embryonic Sonic Hedgehog-dependent modification of the size of a serotonergic neuronal group localized in their hypothalamus causes a shift in their behavioral pattern: instead of fighting, they search for food. Here we further discuss the origin and nature of this behavioral shift.

#### Experimental Evidences for Loss and Gain of Behaviors in Cavefish

Because cavefish are blind, it was impossible to use the classical “mirror test” that most researchers working on agonistic behavior use; so we used a “resident-intruder assay” modified from Espinosa and colleagues<sup>1</sup> (Fig. 1A). With this setup, we counted the number of attacks between the two fish, and the patterns of attacks along the one hour test were also thoroughly analyzed (Fig. 1BC).

Quantitatively, surface fish are about ten times more aggressive than cavefish. Qualitatively, attacks between two surface fish occur in the second half of the test, whereas attacks between two cavefish occur at the beginning of the test. This later result gave us a hint that the attacks recorded between two surface fish or between two cavefish may not have the same signification at all (Fig. 1B and C).

We propose that surface fish attacks, driven by low levels of 5HT in the raphe, correspond to the establishment of hierarchical order between the two opponents. The attacks therefore increase in frequency as the test progresses, with dominance being established. For cavefish, we propose instead that “attacks” correspond to food searching attempts, these blind animals sensing vibrations that may indicate a prey in the environment when the intruder is transferred into the resident box.<sup>2</sup> This foraging behavior is controlled by hypothalamic 5HT neurons, whose number is increased in cavefish due to increased Sonic Hedgehog signaling during early embryogenesis<sup>3</sup>—A signaling modification that also leads them to lose their eyes.<sup>4,5</sup> Our model is well supported by the results observed in various experimental conditions, after pharmacological or embryonic perturbations (Fig. 1, panels B1–C2 and legends). In particular, the use of compounds such as fluoxetine or deprenyl which increase 5HT levels show that aggressiveness and raphe 5HT levels are inversely correlated. Moreover, strong support for cavefish “attacks” actually being food searching behavior come from our finding that starved cavefish are 75% more “aggressive” than normal-fed

**Keywords:** *Astyanax mexicanus*, evolution, brain development, Sonic Hedgehog, serotonin, aggressive behaviour, social behaviour, foraging behaviour, hypothalamus, raphe

Submitted: 12/06/12

Accepted: 12/07/12

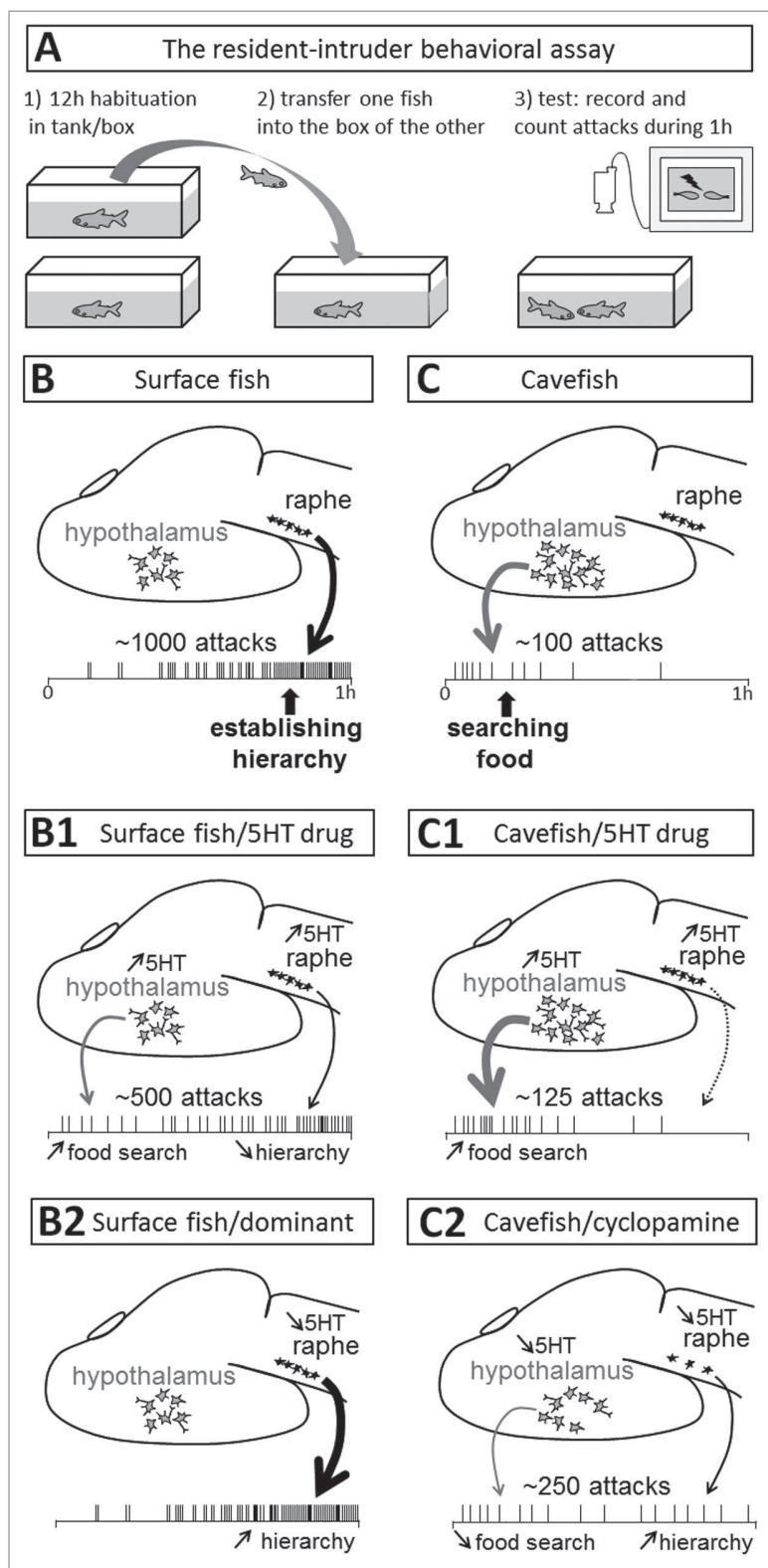
<http://dx.doi.org/10.4161/cib.23166>

Citation: Rétaux S, Elipot Y. Feed or fight: A behavioral shift blind cavefish. *Commun Integr Biol* 2013; 6: e23166

\*Correspondence to: Sylvie Rétaux;  
Email: [retaux@inaf.cnrs-gif.fr](mailto:retaux@inaf.cnrs-gif.fr)

Addendum to: Elipot Y, Hinaux H, Callebort J, Rétaux S. Evolutionary Shift from Fighting to Foraging in Blind Cavefish through Changes in the Serotonin Network. *Curr Biol* 2012; 23:1–10; PMID:23159600.





**Figure 1.** Link between aggressive behavior, food searching behavior, and serotonergic neurotransmission in surface fish and cavefish brains. **(A)** Depicts the behavioral test used to measure *Astyanax* aggressive behavior. **(B–C)** Correlation between brain neuroanatomy and recorded behavioral pattern. The top drawing shows a schematic brain in lateral view with anterior to the left, on which serotonergic neurons of the hypothalamus (gray) and the raphe nucleus (black) are indicated. The bottom schema shows attacks (vertical lines) distributed over time during the one hour behavioral test. **(B)** In surface fish, the experience-dependent regulation of serotonin levels in the raphe drives attacks which increase progressively in frequency during the test, which are very numerous, and which correspond to establishment of dominance between the two fish. **(C)** In blind cavefish, there is apparently no such regulation of raphe serotonin levels. Rather, the developmental evolution of a serotonergic hypothalamic neuronal group drives attacks which occur only at the beginning of the test, which are very few, and which correspond to foraging behavior. **(B1–C2)** correlation between brain 5HT circuits and behavioral patterns in various experimental conditions. **(B1)** In surface fish with pharmacologically-increased 5HT levels (after fluoxetine or deprenyl treatment) early attacks are slightly increased due to increased 5HT in the hypothalamus, and late attacks are strongly diminished, due to increased 5HT in the raphe. The total number of attacks is about 50% of a control surface fish test. **(C1)** In cavefish with pharmacologically-increased 5HT levels, food searching at the beginning of the test is further increased when compared with control cavefish, leading to a slight increase in the total number of attacks. There is no raphe-driven effect. **(B2)** In dominant surface fish, whose raphe 5HT levels are low as measured by HPLC, there are only late and numerous “hierarchy-type” attacks. **(C2)** In cavefish that have been treated with the Shh signaling inhibitor cycloppamine early in development, when 5HT neurons differentiate, the number of 5HT neurons is reduced, both in the hypothalamus and in the raphe. The behavioral correlate is a decrease in food searching at the beginning of the test, due to decreased 5HT transmission in the hypothalamus; and an increase in late attacks, because the 5HT raphe levels are low and therefore drive some “dominance-like” behavior. Accordingly, the global number of attacks is increased when compared with a control cavefish test.



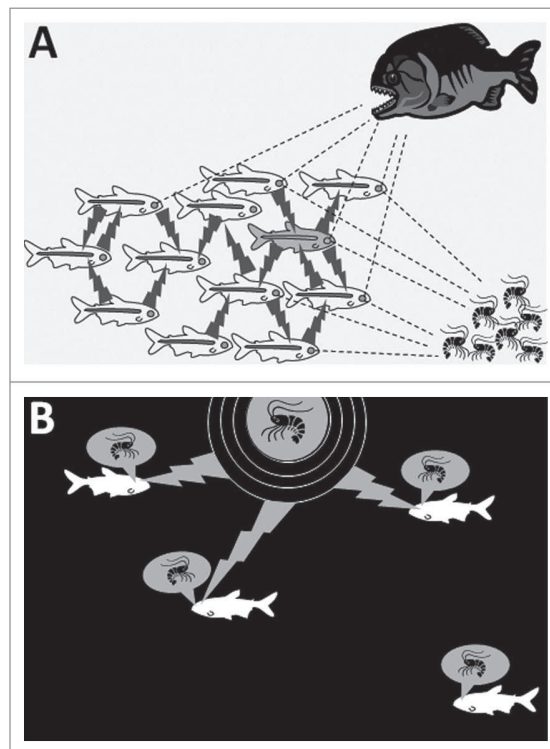
or over-fed cavefish, with the attacks always occurring at the beginning of the test.<sup>3</sup>

### Loss of Aggressiveness

We would like to propose that the loss of aggressiveness in cavefish is related to a general loss of social behaviors during their evolution in the subterranean environment (Fig. 2). Strikingly, surface fish school or shoal intensely, with a dominant individual (usually a female) leading the group, at the top of a hierarchy pyramid including moderately and severely subordinate individuals.<sup>3</sup> It is thought that this type of collective behavior protects from predation<sup>6</sup> and helps finding food sources. During reproductive behavior also, we have observed coordinated and collective behaviors in surface fish (personal observations). Cavefish on the contrary do not school: they swim independently from each other, both in their natural ponds and in a laboratory aquarium. Their reproductive behavior is also different, as they only have very rapid contacts when the male fertilizes the eggs spawned by the female (personal observations). Certainly, cavefish do not lack social behavior because they do not see: blind fish can school,<sup>7,8</sup> and in the case of *Astyanax* cavefish, their increased lateral line probably confers them with ample navigational capabilities. However, we propose that it is probably advantageous to lack collective swimming in caves. Indeed, the subterranean environment is characterized by no or rare predators, food scarcity, and total darkness. There, isolated swim is probably more efficient to find the rare food particles that drop onto the water, and which are precisely detected by the lateral line system through the VAB, the vibration attraction behavior.<sup>2,9</sup> It will be very interesting to analyze whether a re-wiring of the neuromasts sensory circuits occurred during cavefish evolution in the dark.

### Gain of Feeding Behavior

In the dark, cavefish are four times more efficient at finding food than surface fish.<sup>10</sup> This excellent ability to find food is certainly one of the reasons for their success in cave colonization, and probably



**Figure 2.** Loss of collective behaviors in cavefish. The visual sense is depicted by dotted lines. The lateral line, neuromast-mediated sense is depicted by thunderstorm arrows. **(A)** Surface fish shoal or school. This collective behavior is dependent on the lateral line system.<sup>8</sup> The dominant fish in the school has low raphe 5HT levels (gray fish). Prey detection and escape from predators also depend on the lateral line, but relies heavily as well on the visual sense in a lighted environment. **(B)** Blind cavefish do not shoal or school, they perform isolated swim. Their increased lateral line helps them navigate in the dark and finding food through the VAB (vibration attraction behavior),<sup>2</sup> in the absence of visual sense. Their motivation to search and find food is high, probably governed by hypothalamic circuits, including a large 5HT neuronal group.

results from several subtle modifications in their brains, governing such a complex trait. For example they feed on the bottom of the substrate with a fixed feeding angle that is different from surface fish and that is more efficient,<sup>11</sup> and they show an increased and continuous swimming/exploratory behavior.<sup>3</sup> Both constitute motor control changes. They use the VAB to locate food,<sup>2</sup> which constitutes a sensory change. We also propose that one of their hypothalamic cell groups controls the intensity of foraging behavior, therefore potentially representing a regulatory change in motivation for food or in mechanisms controlling hunger and satiety.<sup>3</sup> Interestingly and in the same line, modifications in transcription levels of receptors for neurotransmitter such as glutamate or cannabinoids were recently discussed in terms of their potential enhancement of cavefish behavioral drive toward food

and reproduction.<sup>12</sup> The neurophysiological bases of these motor, sensory, and regulatory changes in the cavefish brain are not known, and their developmental bases begin to be deciphered. Besides the role of Shh in cavefish eye degeneration,<sup>4</sup> Yamamoto et al. have also shown the Shh-dependence of the increase in tastebud number in cavefish,<sup>13</sup> and we have demonstrated the Shh-dependence of cell migration to their olfactory bulbs,<sup>14</sup> of the size of their hypothalamus as a whole<sup>5,14</sup> and on the size of a particular serotonergic cell group in their hypothalamus.<sup>3</sup> Therefore, the embryonic modifications in early Shh morphogen signaling seems to pleiotropically affect the developmental evolution of the cavefish brain (discussed in ref. 15).

**Disclosure of Potential Conflicts of Interest**  
No potential conflicts of interest were disclosed.



## Acknowledgments

Our work is supported by an ANR grant [ASTYCO] to S.R.

## References

1. Espinasa L, Yamamoto Y, Jeffery WR. Non-optical releasers for aggressive behavior in blind and blinded *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Behav Processes* 2005; 70:144-8; PMID:16054777; <http://dx.doi.org/10.1016/j.beproc.2005.06.003>.
2. Yoshizawa M, Goricki S, Soares D, Jeffery WR. Evolution of a behavioral shift mediated by superficial neuromasts helps cavefish find food in darkness. *Curr Biol* 2010; 20:1631-6; PMID:20705469; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2010.07.017>.
3. Elipot Y, Hinaux H, Callebert J, Rétaux S. Evolutionary Shift from Fighting to Foraging in Blind Cavefish through Changes in the Serotonin Network. *Curr Biol* 2012; 23:1-10; PMID:23159600.
4. Yamamoto Y, Stock DW, Jeffery WR. Hedgehog signalling controls eye degeneration in blind cavefish. *Nature* 2004; 431:844-7; PMID:15483612; <http://dx.doi.org/10.1038/nature02864>.
5. Pottin K, Hinaux H, Rétaux S. Restoring eye size in *Astyanax mexicanus* blind cavefish embryos through modulation of the Shh and Fgf8 forebrain organising centres. *Development* 2011; 138:2467-76; PMID:21610028; <http://dx.doi.org/10.1242/dev.054106>.
6. Handegard NO, Boswell KM, Ioannou CC, Leblanc SP, Tjøstheim DB, Couzin ID. The dynamics of coordinated group hunting and collective information transfer among schooling prey. *Curr Biol* 2012; 22:1213-7; PMID:22683262; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.04.050>.
7. Pitcher TJ, Partridge BL, Wardle CS. A blind fish can school. *Science* 1976; 194:963-5; PMID:982056; <http://dx.doi.org/10.1126/science.982056>.
8. Partridge BL, Pitcher TJ. The sensory basis for fish schools: relative roles of lateral line and vision. *J Comp Physiol* 1980; 135:315-25; <http://dx.doi.org/10.1007/BF00657647>.
9. Yoshizawa M, Jeffery WR. Evolutionary tuning of an adaptive behavior requires enhancement of the neuromast sensory system. *Commun Integr Biol* 2011; 4:89-91; PMID:21509190.
10. Hüppop K. Food-finding ability in cave fish (*Astyanax fasciatus*). *Int J Speleol* 1987; 16:59-66.
11. Wilkens H. Evolution and genetics of epigeal and cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). Support for the neutral mutation theory. In: Hecht, MK, Wallace, B (Eds) *Evolutionary Biology* 1988 vol 23 Plenum, New York and London, 271-367.
12. Strickler AG, Soares D. Comparative genetics of the central nervous system in epigeal and hypogeal *Astyanax mexicanus*. *Genetica* 2011; 139:383-91; PMID:21318738; <http://dx.doi.org/10.1007/s10709-011-9557-1>.
13. Yamamoto Y, Byerly MS, Jackman WR, Jeffery WR. Pleiotropic functions of embryonic sonic hedgehog expression link jaw and taste bud amplification with eye loss during cavefish evolution. *Dev Biol* 2009; 330:200-11; PMID:19285488; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.03.003>.
14. Menuet A, Alunni A, Joly JS, Jeffery WR, Rétaux S. Expanded expression of Sonic Hedgehog in *Astyanax* cavefish: multiple consequences on forebrain development and evolution. *Development* 2007; 134:845-55; PMID:17251267; <http://dx.doi.org/10.1242/dev.02780>.
15. Jeffery WR. Pleiotropy and eye degeneration in cavefish. *Heredity* (Edinb) 2010; 105:495-6; PMID:20179737; <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.2010.7>.





### I.3 Discussion

Notre étude montre que les CF « s'attaquent » globalement beaucoup moins que les SF. Ils ont donc perdu leur agressivité. Cependant, lorsque l'occurrence des attaques est analysée en fonction du temps, on observe que les CF s'attaquent uniquement au début du test alors que les SF n'attaquent principalement que dans la deuxième moitié du test, la fréquence de leurs attaques augmentant au cours du temps.

Notre hypothèse est que, pour les CF, « l'agressivité » correspond en réalité à de la recherche de nourriture. De fait, lorsqu'un poisson isolé se retrouve brutalement en présence d'un autre individu, sa ligne latérale est stimulée et le comportement de VAB se déclenche. Le poisson recherchera donc de la nourriture et il va « chasser » l'autre. Avec le temps, le comportement de recherche de nourriture s'estompe et, les *Astyanax* ne tuant pas leurs congénères pour les manger, les attaques cessent. Cette hypothèse est renforcée par le fait que des CF qui ont été à jeun pendant plusieurs semaines réaliseront plus « d'attaques », tout en conservant le même pattern. Le comportement de recherche de nourriture est dans ce cas plus frénétique mais il s'estompe de la même manière avec le temps.

Au contraire, les SF ne s'attaquent pas au début du test. Nous suggérons que dans un premier temps, les deux poissons s'observent et déterminent l'ordre hiérarchique. Dans un second temps, le poisson dominant va soumettre le subordonné en l'attaquant. De fait, on observe une augmentation de la fréquence des attaques au fur et à mesure que la hiérarchie se met en place entre les deux individus. Cette hypothèse est renforcée par l'abolition de ce pattern et une diminution du nombre d'attaques lorsque les animaux sont à jeun depuis plusieurs semaines. En effet, dans ces conditions les animaux diminuent leur métabolisme (Salin et al., 2010). Dans ce cas, mettre en place une hiérarchie serait délétère car le poisson dominant consomme de l'énergie pour pourchasser le subordonné et ce dernier doit fuir et régénérer les tissus lésés lors de l'attaque.



Les traitements pharmacologiques ont permis de montrer que chez les SF, le taux de sérotonine est inversement corrélé à l'agressivité. Cela renforce encore l'hypothèse « d'agressivité hiérarchique » car les dosages HPLC des taux de sérotonine montrent que les poissons dominants possèdent significativement moins de sérotonine au niveau de leur raphé. Cette structure semble donc impliquée dans le comportement social chez l'*Astyanax*.

Par ailleurs, dans certains cas, l'augmentation du taux de sérotonine des CF provoque une modification de leur agressivité, les poissons attaquant plus et pendant une période plus longue. Ce résultat suggère qu'une partie du système sérotoninergique est impliquée dans la recherche de nourriture. Les noyaux sérotoninergiques de l'hypothalamus, en particulier le noyau paraventriculaire antérieur, sont de bons candidats. Il est en effet connu que l'hypothalamus contrôle l'homéostasie et le noyau paraventriculaire se situe à proximité de neurones exprimant le neuropeptide NPY (Lise Prunier, données non publiée de l'équipe), neuropeptide connu pour avoir une action oréxigène (Volkoff et al., 2009). De plus, les immunohistochimies anti-sérotonine ont montré que les CF présentent un noyau paraventriculaire significativement plus gros et contenant plus de neurones que celui des SF.

L'amplification de ce noyau est une conséquence de l'extension du territoire d'expression de *Shh* pendant le développement. De fait, un traitement à la cyclophamide, inhibiteur de la signalisation de *Shh* (Chen, 2002), permet, entre autres, de diminuer significativement la taille de ce noyau. L'analyse de l'agressivité des CF traités à la cyclophamide montre une augmentation du nombre d'attaque et une atténuation du pattern d'agressivité. Ces variations comportementales peuvent être expliquées par la diminution du système sérotoninergique hypothalamique qui induit une diminution de la fréquence d'attaque au début du test. De plus, le système sérotoninergique étant également réduit au niveau du raphé, on peut suggérer qu'il y a une augmentation des attaques en fin de test, résultant d'un phénotype « pseudo-dominant ».



Nous pouvons suggérer que la perte du comportement agressif des CF peut être due à trois facteurs.

Premièrement, nous avons vu que l'agressivité et le taux de sérotonine est inversement corrélé à l'agressivité. Or, l'extension du territoire d'expression de *Shh* induit une amplification du système sérotoninergique. Il est possible que la perte de l'agressivité des CF soit due à la pléiotropie de *Shh*. De fait, cette extension provoque la dégénérescence du cristallin, l'augmentation du nombre de bourgeons gustatifs (Yamamoto et al., 2009) et une augmentation de la migration cellulaire vers les bulbes olfactifs (Menuet et al., 2007). Ces caractères sont importants pour l'adaptation à la vie cavernicole. Il est possible que la perte de l'agressivité soit un « dommage collatéral » provoqué par l'amplification du système sérotoninergique nécessaire pour l'augmentation de la recherche alimentaire.

Deuxièmement, la perte de l'agressivité a sans doute été sélectionnée au cours de l'évolution. De fait, les SF diminuent significativement leur agressivité lorsqu'ils sont à jeun. Les CF ont naturellement un hypométabolisme (Salin et al., 2010), ce qui peut induire une perte de l'agressivité. De plus, l'agressivité est probablement délétère dans les cavernes car l'apport de nourriture y est faible, l'énergie dépensée pour pourchasser les autres individus et pour régénérer les tissus après les attaques est défavorable pour l'agresseur comme pour la victime.

Enfin, nous avons mis en évidence que le comportement agressif des SF est étroitement lié au comportement hiérarchique existant au sein du banc. Or, les CF ont perdu le comportement de nage en banc. L'absence de nage en banc induit la perte du comportement hiérarchique et donc de l'agressivité des CF. Nous pouvons suggérer que la nage en banc est délétère dans l'environnement cavernicole. En effet, en l'absence de vision, la ligne latérale et l'olfaction sont les deux sens les plus importants pour la recherche de nourriture. Or, au sein d'un banc, les vibrations émises par une source de nourriture sont difficilement différenciables des mouvements d'eau formés par la nage des congénères. De même, le gradient odorant émis par une source est perturbé par la nage des poissons, rendant difficile la localisation de la nourriture. De plus, dans le cas où de la nourriture est présente en petite



quantité, la chance de manger est d'autant plus faible que la densité de poisson aux alentours est forte (avec l'augmentation de la concurrence), rendant la nage en banc défavorable à la survie des poissons en environnement cavernicole.

Par ailleurs, il est possible que la perte de la nage en banc soit un autre « dommage collatéral » induit par l'adaptation à la vie cavernicole. De fait, Pitcher a montré que chez le lieu noir, la formation d'un banc fonctionne avec un équilibre de force d'attraction/répulsion entre les individus (Pitcher et al., 1976). Si un poisson est rendu aveugle (en collant une pastille opaque sur les yeux), il est toujours capable de nager au sein du banc mais celui-ci nagera à une distance plus importante qu'un poisson voyant. Cela signifie que la vision est responsable des forces d'attraction. Dans le cas où la ligne latérale d'un lieu est sectionnée chirurgicalement, celui-ci peut continuer à nager au sein du banc mais la distance le séparant des autres sera plus faible. La ligne latérale est donc responsable des forces de répulsion. Un lieu noir rendu aveugle et dont la ligne latérale a été sectionnée ne peut plus nager dans le banc (Pitcher et al., 1976). Dans le cas des *Astyanax* cavernicoles, les poissons sont aveugles et possèdent une ligne latérale surdéveloppée (Jeffery, 2001; Montgomery et al., 2001; Yoshizawa et al., 2010, 2012). D'un point de vue de ces forces, cela signifie que les CF ne sont soumis à aucune force d'attraction mais qu'au contraire ils subissent une force de répulsion importante. Cela rend probablement impossible la formation de groupes et cela peut donc expliquer la perte de la nage en banc chez les *Astyanax* cavernicoles.





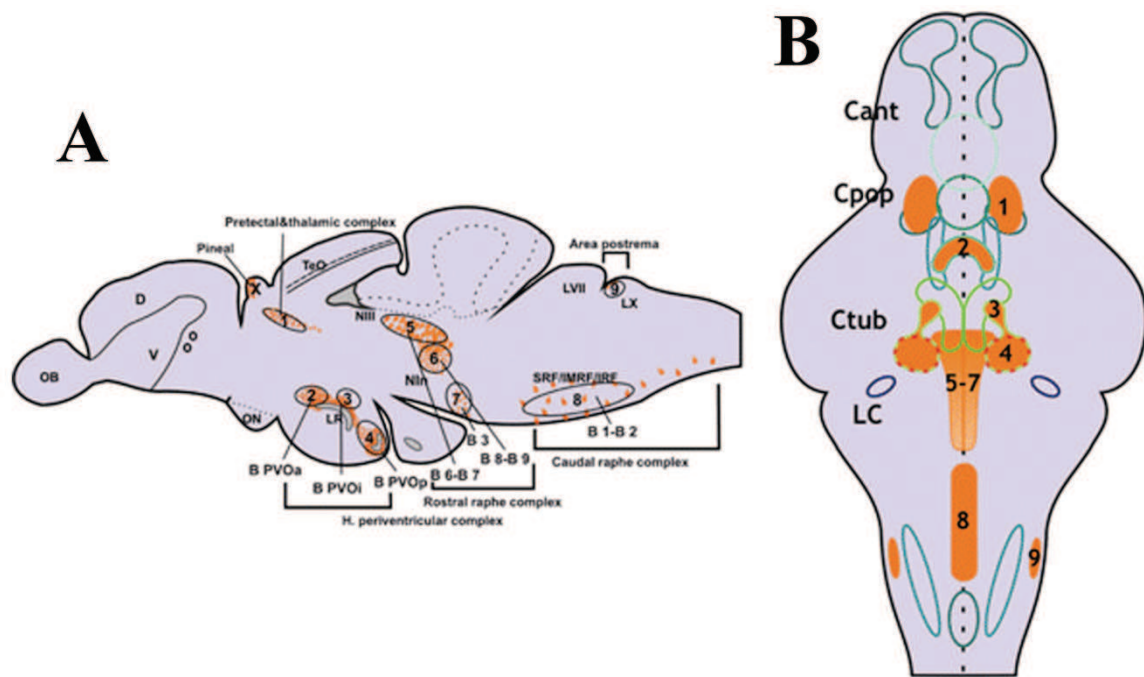
## II Evolution des systèmes aminergiques chez le poisson aveugle *Astyanax Mexicanus*

### II.1 Présentation

Les systèmes aminergiques sont les principaux neuromodulateurs du système nerveux des vertébrés. Un neurotransmetteur est dit « aminergique » lorsqu'il est synthétisé à partir d'un acide aminé. Au vu des variations du système sérotoninergique observées dans le chapitre I, nous avons, en collaboration avec Jacques Callebert et Jean-Marie Launay, mesuré par HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) les concentrations des molécules phares des systèmes aminergiques dans l'encéphale des SF et des CF. Le but de ces expériences est de déterminer si d'autres systèmes de neurotransmission ont été modifiés chez les populations cavernicoles.

Du point de vue des systèmes aminergiques ayant pour origine l'acide aminé tryptophane, les molécules qui ont été dosées sont la sérotonine et son métabolite final, le 5-HIAA (acide 5-hydroxyindolacétique), ainsi que la mélatonine, substance dérivée de la sérotonine (figure 1 de l'article suivant). Cette dernière est connue pour contrôler l'alternance veille-sommeil chez les vertébrés (Elbaz et al., 2013; Zhdanova, 2011). Sachant que le CF a perdu 70% de son temps de sommeil, il est possible que des modifications de cette voie existent chez les CF.

Certaines différences existent au niveau de la synthèse de ces neurotransmetteurs entre les poissons et les mammifères. En premier lieu, les poissons possèdent deux gènes de la tryptophane hydroxylase (Tph) (Bellipanni et al., 2002), première enzyme de la chaîne de synthèse de la sérotonine, alors que les mammifères n'en possèdent qu'une. A l'inverse, la monoamine oxydase (MAO), enzyme permettant la dégradation de la sérotonine ainsi que des autres neurotransmetteurs aminergiques (Anichtchik et al., 2006; Sallinen et al., 2009; Setini et al., 2005), existe sous deux isoformes chez les mammifères, les amphibiens et les oiseaux (Naoi et al., 2012; Nicotra et al., 2004; Ramsay, 2012; Vitalis et al., 2002, 2003). La MAO-A dégrade préférentiellement les neurotransmetteurs catécholaminergiques alors que la MAO-B



**Figure 61 : Le système sérotoninergique du poisson zèbre**

Schéma d'une coupe sagittale d'un cerveau de poisson zèbre adulte (A) et d'une coupe horizontale d'un cerveau à 72hpf (B). Les cellules sérotoninergiques sont représentées en orange. La numérotation des noyaux est similaire en (A) et (B). Les cercles en (B) représentent les cellules exprimant la TH. D'après (Sallinen et al., 2009).

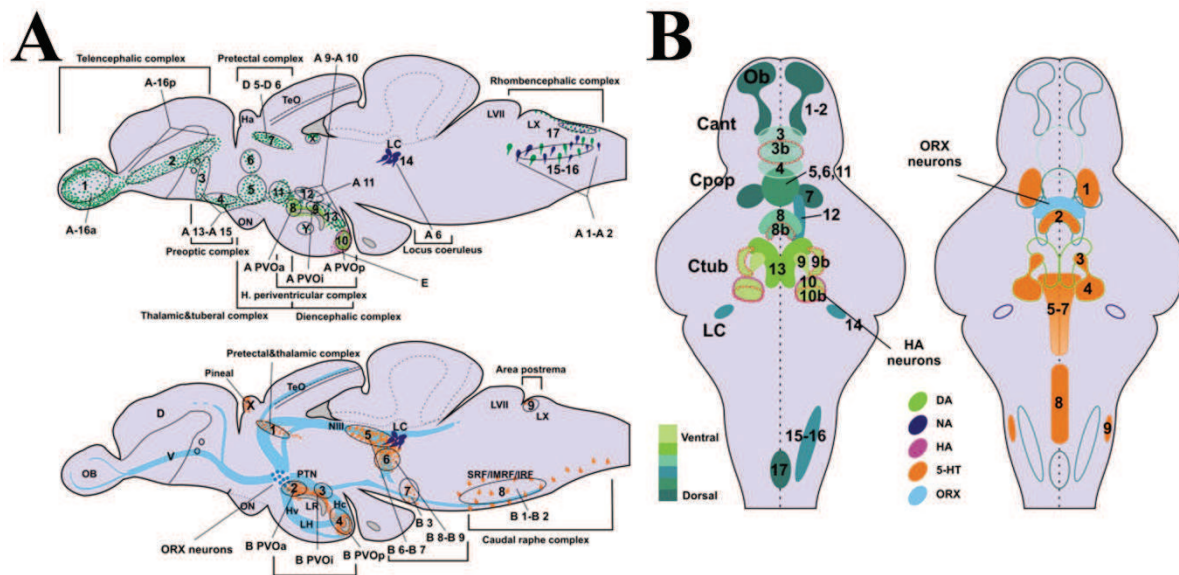
Abréviations : anterior commissure (Cant), post-optic commissure (Cpop), the commissure of the posterior tuberculum (Ctub), dosal telencephalic area (D), intermediate reticular formation (IMRF), inferior reticular formation (IRF), *Locus coeruleus* (LC), lateral recesses of diencephalic ventricle (LR), facial lobe (LVII), vagal lobe (LX), oculomotor nucleus (NIII), intrpeduncular nucleus (Nln), olfactive bulbs (OB), optic nerve (ON), anterior part of paraventricular organ (PVOa), intermediate part of paraventricular organ (PVOi), posterior part of paraventricular organ (PVOp), superior reticular formation (SRF), optic tectum (TeO), ventral telencephalic area (V).

a une meilleure affinité pour la sérotonine et l'histamine (Vitalis et al., 2002). Cependant, une seule forme a été trouvée chez les poissons téléostéens étudiés, comme l'épinoche, le poisson zèbre, le guppy, la truite, la carpe, le poisson chat et le brochet (Anichtchik et al., 2006; Chen et al., 1994; Ekström and Van Veen, 1984; Kumazawa et al., 1998; Nicotra and Senatori, 1989; Senatori et al., 1990, 2009; Setini et al., 2005). Cette enzyme semble regrouper à la fois les activités de la MAO A et B. L'activité enzymatique est détectée dès les stades précoces et est très importante pour le bon développement du système nerveux (Vitalis et al., 1998, 2002, 2003).

Le système sérotoninergique des téléostéens est organisé en plusieurs noyaux. Certains sont présents dans le raphé, comme chez les mammifères, mais les téléostéens ont la particularité de posséder aussi des neurones sérotoninergiques dans l'hypothalamus antérieur, médian et postérieur (figure 61). De fait, ces neurones ont été observés chez l'épinoche (Ekström and Van Veen, 1984; Ekström et al., 1985), le poisson zèbre (Bellipanni et al., 2002; Lillesaar, 2011; Sallinen et al., 2009), et l'*Astyanax* (Elipot et al., 2013).

Pour ce qui concerne les systèmes catécholaminergiques, c'est-à-dire des neurotransmetteurs synthétisés à partir de l'acide aminé tyrosine, nous avons dosé le taux de dopamine et ses dérivés, la noradrénaline et l'adrénaline. Les concentrations des métabolites DOPAC (acide 3,4-dihydroxyphényl acétique), HVA (acide homovanillique) et VMA (acide vanillyl mandélique) ont aussi été mesurées.

Des duplications des gènes dont la protéine a un rôle dans la synthèse ou la dégradation des catécholamines ont eu lieu chez les téléostéens. Deux isoformes de la tyrosine hydroxylase (TH), première enzyme de la chaîne de synthèse de la dopamine (figure 1 de l'article), existent (Candy and Collet, 2005; Yamamoto et al., 2010). De même, deux isoformes de l'enzyme de dégradation catéchol-O-méthyltransférase (COMT) sont présentes chez les téléostéens (Panula et al., 2010).



**Figure 62 : Localisation des systèmes aminergiques chez le poisson zèbre**

(A) Schéma d'une coupe sagittale d'un cerveau de poisson zèbre adulte. Le code couleur indique les noyaux dopaminergiques (DA), noradrénergiques (NA), sérotoninergiques (5-HT), histaminergiques (HA) et oréxigéniques (ORX). Les catécholamines sont révélées uniquement avec l'expression de la TH1 (les cellules exprimant la TH2 ne sont pas représentées). Les fibres hypocretinergiques sont représentées en bleu ciel (en bas).

(B) Schéma d'une coupe horizontale d'un cerveau de poisson zèbre à 72hpf. Les noyaux catécholaminergiques sont représentés (à gauche), le code couleur indiquant leur position suivant l'axe dorso-ventral. Les cercles en pointillés rouges indiquent l'expression de la TH2 (et les noyaux correspondant portent l'indication « b »). Les numéros correspondent aux noyaux catécholaminergiques (en (A) en haut et en (B) à gauche) ou aux noyaux sérotoninergiques (en (A) en bas et en (B) à droite). D'après (Panula et al., 2010).

Abréviations : anterior commissure (Cant), post-optic commissure (Cpop), the commissure of the posterior tuberculum (Ctub), dosal telencephalic area (D), habenula (Ha), caudal zone of periventricular hypothalamus (Hc), ventral zone of periventricular hypothalamus (Hv), intermediate reticular formation (IMRF), inferior reticular formation (IRF), *Locus coeruleus* (LC), lateral hypothalamic nucleus (LH), lateral recesses of diencephalic ventricle (LR), facial lobe (LVII), vagal lobe (LX), oculomotor nucleus (NIII), intrpeduncular nucleus (Nln), olfactory bulbs (OB), optic nerve (ON), posterior tuberculum (PTN), anterior part of paraventricular organ (PVOa), intermediate part of paraventricular organ (PVOi), posterior part of paraventricular organ (PVOp), superior reticular formation (SRF), optic tectum (TeO), ventral telencephalic area (V).

Les systèmes catécholaminergiques peuvent être visualisés en analysant les territoires d'expression des THs. Ces enzymes étant les premières intervenantes dans la chaîne de synthèse des catécholamines, elles sont des marqueurs de choix pour révéler ces types neuronaux. On peut observer que de nombreux noyaux sont présents dans l'ensemble de l'encéphale. Comparé aux mammifères, les systèmes catécholaminergiques des poissons zèbres (représentés figure 62) présentent des différences principalement au niveau de l'hypothalamus et du tuberculum postérieur. De fait, des noyaux dopaminergiques présents dans le mésencéphale des mammifères n'ont pas d'homologue chez les poissons zèbres. A l'inverse, des neurones dopaminergiques sont présents au niveau de la zone paraventriculaire hypothalamique des téléostéens alors que, chez les mammifères, aucune cellule n'exprime la TH dans cette région (Yamamoto and Vernier, 2011). Ces cellules expriment le gène TH2 chez les téléostéens. Yamamoto propose que ce gène existait chez l'ancêtre des vertébrés et qu'il a ensuite été perdu chez les mammifères (Yamamoto and Vernier, 2011).

Il est important de doser à la fois les concentrations des neurotransmetteurs et de leurs métabolites car le ratio des concentrations permet de déterminer si la neurotransmission est plus ou moins active chez l'animal. De fait, si le ratio des concentrations métabolite/neurotransmetteur est élevé, cela signifie que le neurotransmetteur est métabolisé et donc peu actif. A l'inverse, un ratio faible suppose que le neurotransmetteur n'est que peu dégradé et donc que la neurotransmission est importante.

L'analyse de l'activité de neurotransmission pose la question de l'activité des enzymes impliquées dans l'anabolisme et le catabolisme des neurotransmetteurs. En particulier, l'activité de la monoamine-oxydase (MAO), principale enzyme de dégradation de la sérotonine et impliquée dans la dégradation des catécholamines (Anichtchik et al., 2006; Sallinen et al., 2009; Setini et al., 2005), est étudiée. Enfin, afin d'intégrer les informations obtenues, les résultats sont complétés par une comparaison histologique des systèmes aminergiques entre les SF et les CF et des territoires d'expression de la MAO. L'activité *in situ* de cette enzyme est également analysée.

L'étude des systèmes aminergiques des téléostéens est importante car, bien que certaines différences existent, l'organisation de ces systèmes est globalement similaire à celui des mammifères (Flinn et al., 2008; Panula et al., 2006; Rico et al., 2011) et les processus de



mise en place et de régulation des comportements semblent conservés entre les poissons et les mammifères (Maximino and Herculano, 2010; Norton and Bally-Cuif, 2010). L'étude des modifications des circuits neuronaux et de leurs activités à l'aide de mutants ou, comme c'est le cas ici, de différentes populations, permettent de disséquer ces mécanismes afin de les appliquer sur les mammifères et de mieux comprendre les origines de certaines pathologies psychiatriques.

Les résultats de ce projet font appel à des approches biochimiques, enzymologiques, histologiques et moléculaires. Ils feront l'objet d'une publication qui sera soumise dans les semaines à venir.

## **II.2 Travaux en cours de préparation**





**Reduced monoamine oxidase activity and a hyper-monoaminergic phenotype in the brain of the blind cavefish *Astyanax mexicanus***

**Yannick Elipot, Jacques Callebert<sup>1</sup>, Jean-Marie Launay<sup>1</sup>, Hélène Hinaux, Maryline Blin and Sylvie R etaux\***

DECA Group, N&D Laboratory, CNRS, 91198 Gif sur Yvette, France, and

<sup>1</sup>Service Biochimie et Biologie Mol culaire, Hôpital Lariboisi re, 75475 Paris, France

\* Author for correspondence: [retaux@inaf.cnrs-gif.fr](mailto:retaux@inaf.cnrs-gif.fr)



## Introduction

The characiform fish species *Astyanax mexicanus* exists under two forms: river-dwelling morphs which inhabit rivers in Central America, and cave-adapted morphs which live in the Sierra De El Abra region in Mexico and which are blind and de-pigmented. The two morphs of this single species are advantageously used in comparative evolutionary studies (Jeffery, 2008, 2009). Indeed, during the approximately 1MY since they evolved from their river-dwelling and sighted ancestors, cavefish have evolved a number of morphological, physiological and behavioral traits, most likely in adaptation to the darkness of their subterranean habitat. Here, we sought to investigate potential differences in their brain neurochemistry that could lie behind some of their behavioral evolutions, including changes in aggressiveness (Burchards et al., 1985; Elipot et al., 2013; Espinasa et al., 2005), sleep (Duboue et al., 2012; Duboue et al., 2011), foraging (Elipot et al., 2013), or swimming behavior (Pottin et al., 2010; Windsor et al., 2011; Windsor et al., 2010a, b; Windsor et al., 2008).

Monoamine neurotransmitters are major neuro-modulatory systems in the vertebrate brain. Among them, the most studied are the catecholamines (dopamine/DA, noradrenaline/NA and adrenaline/Adr) and the tryptamines (serotonin/5HT and melatonin/Mel). Catecholamines and tryptamines are synthesized from aromatic amino-acids (tyrosine and tryptophan) through specific biosynthetic pathways involving the rate-limiting enzymes tyrosine hydroxylase (TH) and tryptophan hydroxylase (tpH), respectively. They are transported into vesicles or through neuronal membranes by specific transporter systems (reviewed in (Lin et al., ; Lin and Madras, 2006) and they act on specific pre- and post-synaptic receptors that mostly belong to the family of G-protein coupled receptors (Hoyer et al., 2002; Millan et al., 2008; Neve et al., 2004)for reviews). Finally, they are degraded by specialized intracellular enzymes, the monoamine oxidases (MAO) being key enzymes in this process (Edmondson et al., 2004; Kopin, 1994; Shih et al., 1999). MAO is the only player for serotonin degradation, and also acts for dopamine, noradrenaline and adrenaline catabolism as an alternate pathway with the COMT (catecholamine-O-methyltransferase) pathway (summarized in Figure 1). Due to the major role of monoamines in multiple and varied brain functions, all the molecules involved in synthesis, transport, signal transduction and degradation of these neurotransmitters are psychotherapeutic drug targets.



In the mammalian brain where monoamines have been widely studied, neurons using DA, NA, or 5HT neurotransmitters have most of their cell bodies localized in discrete nuclei of the mesencephalon and rhombencephalon, yet they innervate virtually all brain structures through diffuse and widespread ascending and descending axonal projection systems. Such a comprehensive neuromodulatory control explains why monoamines have been implicated in a variety of functions and processes: attention and arousal (NA), defense and anxiety (DA, 5HT), stress and emotions (DA, NA, 5HT), reward (DA), mood (5HT), appetite and energy expenditure, sleep/wakefulness (5HT, NA, Mel), motor control (DA, 5HT), or cognition and why their deregulation is involved in various pathologies. For example, clinical depression has been associated with a disruption in the normal function and with low levels of the monoamines NA, 5HT and DA (Bonhomme and Esposito, 1998; Scholl et al., 2010).

Monoaminergic systems in fish have recently attracted scientific interest, partly because the zebrafish (*Danio rerio*) appears as a suitable laboratory animal to model some aspects of complex behaviors (Norton and Bally-Cuif, 2010) and to study and screen neuroactive molecules (Kokel et al., 2010; Kokel and Peterson, 2011). Indeed, monoaminergic systems are globally well conserved and seem to serve the same types of functions in fish and mammals, with some anatomical or structural exceptions (reviews Panula 2010; Maximino 2010). These include the presence of 5HT cell bodies in the hypothalamus (Ekstrom et al., 1985; Ekstrom and Van Veen, 1984; Lillesaar, 2011; Lillesaar et al., 2009; Sallinen et al., 2009), and DA cell bodies in the hypothalamus, diencephalic posterior tuberculum and telencephalon (Filippi et al., ; Ma, 2003; Panula et al., ; Ryu et al., 2006; Yamamoto et al., ; Yamamoto et al.) of the fish, respectively, whereas the mammalian neurons are located more posteriorly in the brain. Due to the additional round of genome duplication in the teleost lineage, there are two THs (Candy and Collet, 2005), two tpHs (Bellipanni et al., 2002), more G-protein coupled receptors and two putative COMT genes (Panula et al., 2010) in zebrafish. Conversely and this is a notable exception, there is only one MAO gene in all fish examined so far (zebrafish, carp, trout and rainbow trout, pike and catfish (Anichtchik et al., 2006; Chen et al., 1994; Kumazawa et al., 1998; Nicotra and Senatori, 1989; Senatori et al., 1990; Setini et al., 2005), whereas there are two forms of this enzyme, MAOa and MAOb, in mammals (Grimsby et al., 1991; Grimsby et al., 1990; Zhu et al., 1992).



Here we have compared quantitatively and qualitatively the monoaminergic systems in the brains of the cave and the surface morphs of *Astyanax mexicanus*. We discovered significant differences in the levels, catabolism and neuroanatomy of monoamines between the two morphs, and we found a mutation in the cavefish MAO gene, which are discussed in terms of the known behavioral changes between them.

## **Methods.**

### **Animals.**

Laboratory stocks of *A. mexicanus* surface fish and cavefish (Pachón population) were obtained in 2004-2006 from the Jeffery laboratory at the University of Maryland, College Park, MD, and were since then bred in our local facility. Fish were maintained at 23-26°C on 12:12 hours light: dark cycle and they were fed twice a day with dry and living food. The fry were raised in Petri dishes and fed with two days-old artemia after opening of the mouth (Hinaux et al., 2011). Animals were treated according to the French and European regulations for handling of animals in research. SR's authorization for use of animals in research is number 91-116, and Paris Centre-Sud Ethic Committee authorization number is 2012-0054.

For pharmacological treatment, we used R-deprenyl hydrochloride (Sigma Aldrich) dissolved in tank water. Deprenyl (10µM) was added 5 hours before the sacrifice of the animals.

### **HPLC**

HPLC assays were performed on fresh tissue. Three to 5 month old juvenile fish were euthanized by immersion in ice-cold water for 1 minute, weighed, measured, and sexed. Brains were rapidly dissected out on ice and cut in two parts at the level of the midbrain/hindbrain junction: (1) the anterior part which, in fish, contains the 5HT hypothalamic neurons and the DA telencephalic, hypothalamic and posterior tuberculum neuronal groups and (2) the posterior part which contains the 5HT raphe hindbrain neurons and the locus coeruleus and rhombencephalic NA neurons, which are similar to mammals. Samples were immersed in hydrochloric acid (10<sup>-3</sup>M), weighed, and frozen at -80°C. Prior to analysis, brains were crushed and centrifuged at 22000g for 20 minutes at 5°C. The supernatants were collected and filtered through a 10 kDa membrane (Nanosep, Pall) by





centrifugation at 7000g. Then, a 20  $\mu$ l aliquot of sample was analyzed for serotonin (5HT) by fluorometric detection (Kema). The amounts of catecholamines (dopamine/DA, noradrenalin/NA, and adrenalin/Adr) and their metabolites (DOPAC, HVA) as well as the 5HT metabolite 5-HIAA were measured by electrochemical detection on a serial array of coulometric flow-through graphite electrodes (CoulArray, ESA) (Gamache 1993). The analysis, data reduction, and peak identification were fully automated. Results were expressed as femtomoles/mg of fresh tissue.

### **MAO activity**

*In vitro*. MAO (EC.1.4.3.4.) enzymatic activities were determined on whole brain homogenates by a radioenzymatic assay using either [ $^{14}$ C]-5-HT creatinine sulfate (1.96 GBq/mmol, Amersham GE Healthcare, Saclay, France, final concentration 20  $\mu$ M), or [ $^{14}$ C]- $\alpha$ -phenylethylamine (2.07 GBq/mmol, Amersham GE Healthcare, Saclay, F France, final concentration 20  $\mu$ M), or tyramine (Bq/mmol) as substrate according to (Berlin et al., 1995; Brunner et al., 1993; Denney et al., 1982).

*In situ* MAO enzymatic activities were determined *in situ* on the whole larvae. After euthanasy on ice, larvae were frozen on nitrogen, then placed in a water bath at 37°C for 30 minutes. They were preincubated for 30 minutes in a solution consisting of 1% DMSO (Sigma), 10% of Triton X100 and 10% Tween20 dissolved in 0.05M Tris-HCL buffer (pH 7.6). The labeling appeared after several hours in the reaction solution consisting of diaminobenzidine tetrachloride (DAB, Sigma Aldrich tablets), horseradish peroxidase (ABC kit, Universal Vectastain Kit PK6200), 6 mg.mL<sup>-1</sup> of nickel ammonium sulfate (Nakarai Chemic LS) and 1 mg.mL<sup>-1</sup> of tyramine hydrochloride (Sigma), successively dissolved in 1 ml of 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6).

### **MAO cDNA cloning and sequence analysis**

Total RNA from cavefish and surface fish larvae was reverse transcribed with random primers using AMV reverse transcriptase (Promega). Partial cDNA sequence for MAO (635bp) was amplified by PCR using primers designed on 454 transcriptomic sequence data obtained in a parallel project (HH and SR, unpublished). PCR products were sub-cloned in TOPO-PCR II vector (Invitrogen) and sequenced. *Astyanax* MAO sequences were aligned with family members in other species, and phylogenetic trees were constructed with the Neighbor Joining method using MEGA5.



## **Immunohistochemistry and *in situ* hybridization**

Samples were fixed in PFA (paraformaldehyde 4% in PBS), gradually dehydrated in methanol and stored at -20°C.

For immunohistochemistry, permeabilization was achieved in PBS with 1% DMSO and 0.5% Triton, followed by incubation in a rat anti-serotonin primary antibody (Chemicon MAB 352, 1/200) or mouse anti-tyrosine hydroxylase antibody followed by secondary biotinylated goat anti-rat antibody (Jackson 112-066-072, 1/500) and anti-mouse, respectively. Revelation was performed using an avidin/biotin complex coupled with peroxidase (ABC kit, Universal Vectastain Kit PK6200) and diaminobenzidine (DAB, Sigma Aldrich).

For *in situ* hybridization, MAO cDNA was amplified by PCR, and digoxigenin-labeled riboprobes were synthesised from PCR templates. A protocol for automated whole-mount *in situ* hybridisation (Intavis) was performed (Deyts et al., 2005).

After staining, embryos and/or brains were dissected out, mounted in glycerol, and photographs were taken on a Nikon E800 microscope equipped with a DXM1200 camera. Quantifications of brain areas were performed with ImageJ.

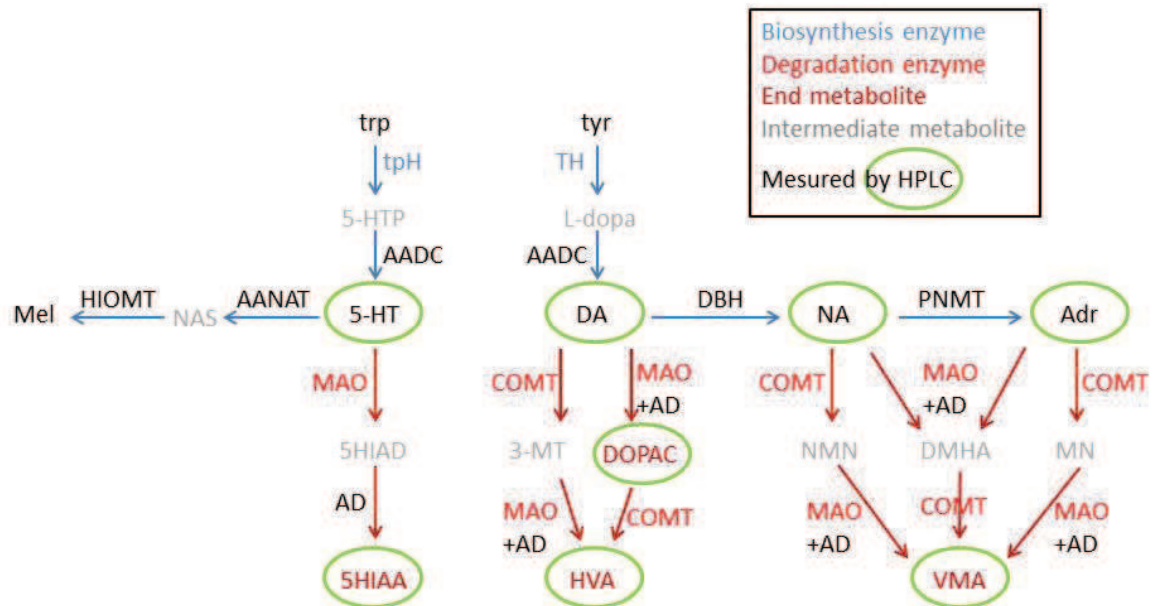
## **Statistical analyses.**

Mann-Whitney statistical tests were used and performed with the Statview software. Values are indicated as mean  $\pm$  SEM. Significance was set at  $p < 0.05$  (\*). \*\*, \*\*\*, and \*\*\*\* correspond to  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  and  $p < 0.0001$ , respectively.



## Results.

For the sake of clarity in the presentation of the results, the synthesis and degradation pathways for monoamines studied here are compiled from the literature and presented in Fig.1. Please refer to this schematic when necessary in the following sections.

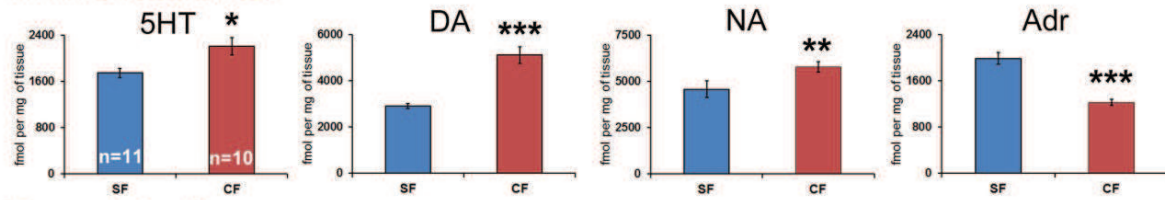


### Different levels of monoamines and their metabolites in surface fish (SF) and cavefish (CF) brains.

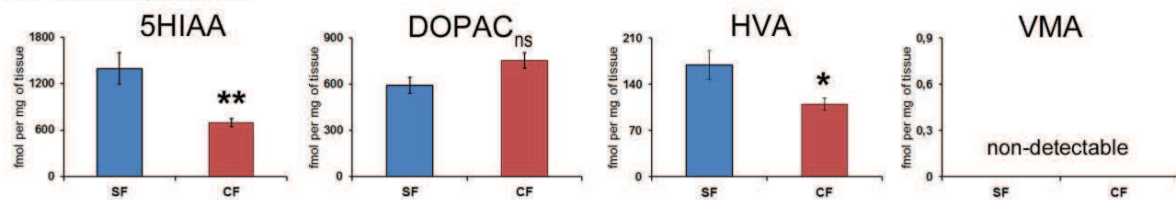
The levels of 5HT, NA, DA, Adr and their metabolites were measured by HPLC in the brains of 3 to 4 month-old juveniles SF and CF. During dissections, two main parts of the brains were separated through a cut at the level of the midbrain/hindbrain junction (see Methods). For simplification the results are given as total brain amounts, and detailed data on anterior/posterior parts of the brain will be used only when necessary for discussion (Suppl. Fig. 1).



### A. monoamines



### B. metabolites



### C. ratios

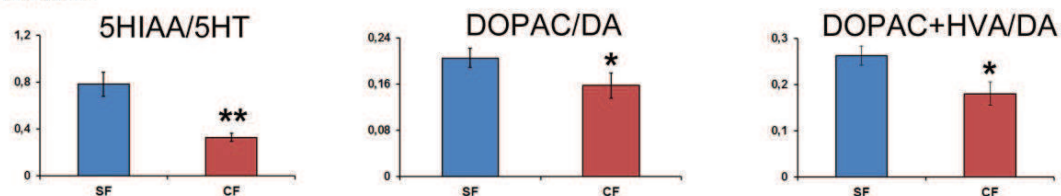


Figure 2

As shown in Fig. 2A, the amounts of 5HT, DA and NA were significantly higher in CF brains. Conversely ADR (which is usually not detectable in mammalian brains) showed significantly higher levels in SF. Thus, globally higher levels of the “primary” monoamines were found in CF brains.

We next compared the levels of monoamine metabolites (Fig. 2B). Surprisingly, VMA (the final metabolite of NA and ADR) was undetectable in the brains of the two *Astyanax* morphs, suggesting that COMT and MAO degrading enzymes do not use NA and ADR as substrates in this fish. This is also consistent with *Astyanax* showing detectable levels of ADR (Fig. 2A). The intermediate DA metabolite DOPAC showed similar levels in SF and CF, while the final DA metabolite HVA was found at lower levels in CF brains. Finally, the 5HT final metabolite 5HIAA levels were twice lower in CF brains (Fig. 2B). These unexpected results point to the possibility that the MAO may have differential activities in SF and CF.





### **Lower metabolite/monoamine ratios in cavefish brains.**

The “activity” or “intensity” index of a neurotransmitter system can be assessed through its metabolite/neurotransmitter ratio: the higher this ratio, the stronger the catabolic activity, the weaker the neurotransmission index. Thus, to obtain a more general comparison of monoaminergic neurotransmission in the *Astyanax* SF and CF brains, we expressed the HPLC results as metabolite/neurotransmitter ratios (Fig. 2C). The 3 ratios we calculated, namely 5HIAA/5HT, DOPAC/DA and DOPAC+HVA/DA were significantly lower in CF brains than in their SF counterparts. This suggests that serotonergic and dopaminergic neurotransmissions are stronger in the CF brain. Moreover, as DOPAC levels are similar in CF and SF brains, the lower DA index in CF brains is mostly due to DA levels only, and may therefore point a SF/CF difference at the level of DA synthesis or at the level of DA degradation by COMT. We thus compared TH activity in SF and CF brain extracts and found no difference (SF:  $0.35 \pm 0.04$  nmoles/mg prot/h, n=8; CF:  $0.39 \pm 0.06$  nmoles/mg prot/h, n=8), ruling out a difference of DA synthesis between the two morphs, and suggesting a differential COMT activity. In addition, the comparatively very low CF 5HT index, being due to both more 5HT neurotransmitter and to less 5HIAA metabolite in CF brains, points to a differential activity of the MAO degrading enzyme in the two *Astyanax* morphs (see Fig. 1: MAO is the only enzyme capable of degrading 5HT).

### **Comparing MAO activity in surface fish and cavefish brains.**

We therefore compared MAO enzymatic activity in total brain extracts from *Astyanax* SF and CF. As noted earlier, all teleosts tested so far have only one MAO (see also next section). From analyses performed on the zebrafish (zf), the structural composition of the active site in zfMAO and its substrate specificities suggest a MAOa-type. However, zfMAO also shows properties of MAOb, such as inhibition by a MAOb specific inhibitor, deprenyl (Sallinen et al., 2009). Thus, we tested MAO activity in *Astyanax* using 3 different substrates: 5HT,  $\beta$ -phenylethylamine or tyramine. In all 3 assays, MAO activity was about twice lower in CF brain extracts (Fig. 3A).



As MAO is the main degradation enzyme for 5HT, these data explain the high 5HT and low 5HIAA levels in the CF brains (Fig. 2AB). However, they do not easily explain our findings on the levels of DOPAC (which are identical in the two morphs). Therefore, and to get a better understanding of MAO activity in the *Astyanax* brain, we measured the levels of monoamines and their metabolites after MAO inhibition by deprenyl. Three to four month-old *Astyanax* cavefish and surface fish were bathed in 10 $\mu$ M deprenyl during 5 hours, and their brains were processed for HPLC. The results were qualitatively identical for the two morphs (Fig. 3B).

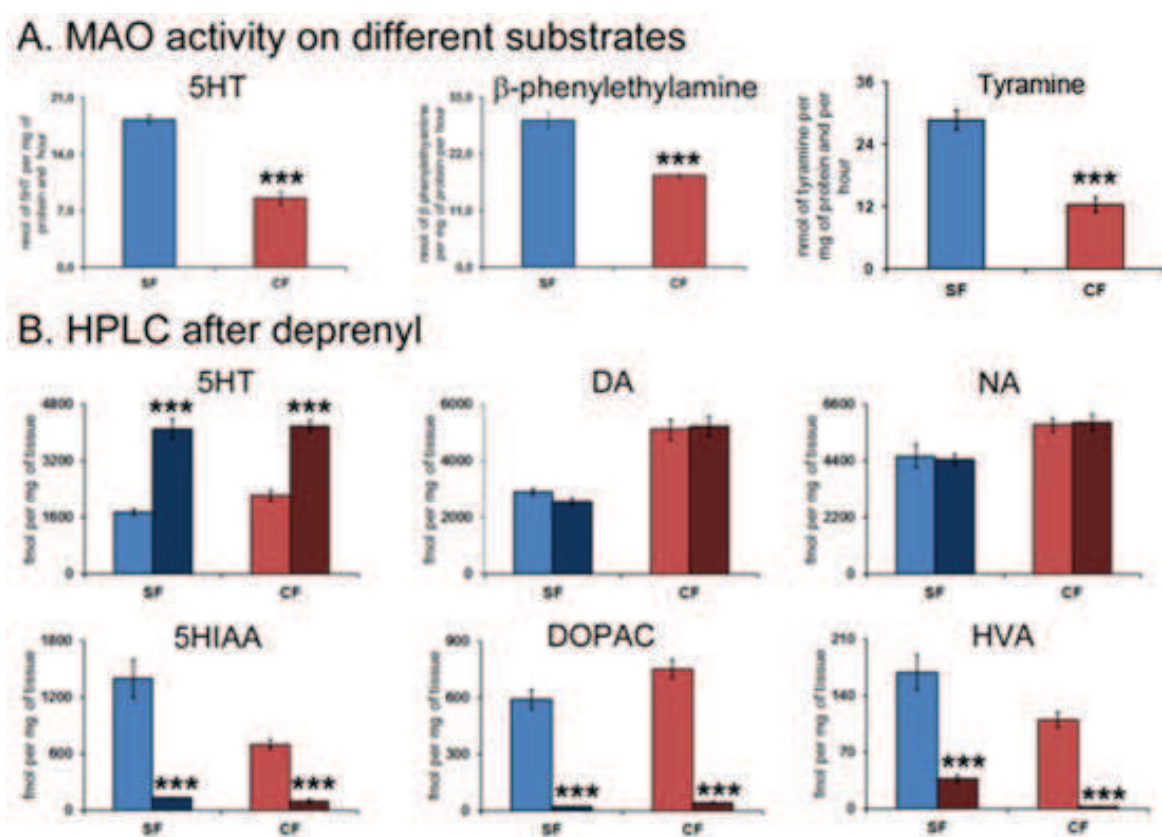


Figure 3

As expected after MAO inhibition, 5HT levels were strongly increased whereas 5HIAA levels were strongly decreased by deprenyl treatment. DOPAC and HVA brain amounts were also significantly diminished after deprenyl, suggesting that a certain amount of DA is degraded by MAO in normal conditions. Surprisingly, DA levels were unaffected after deprenyl. Finally, NA levels were unaffected by deprenyl, consistently with the previously suggested hypothesis that NA is not a good MAO substrate in *Astyanax*, and with the absence of detectable levels of VMA.



We next focused on the low MAO activity in the cavefish brain, and explored two main hypotheses, i.e., a change in MAO sequence and/or a change in MAO expression in CF.

### **A mutation in the cavefish MAO sequence.**

The biochemical data above pointed to a striking difference in MAO activity in CF and SF morphs, explaining most of the “hyper-monoaminergic” biochemical profile in the cavefish brain. We therefore investigated whether CF and SF MAO could present significant sequence differences that may explain their differential enzymatic activity. We cloned partial length 635bp fragments of MAO cDNAs from SF and CF total RNA. After phylogenetic analysis, *Astyanax* MAO grouped consistently with sequences from other teleosts (Fig. 4A). In the absence of the *Astyanax* genome, we cannot rule out the possibility that there are two MAOs in *Astyanax*, but the cloning results and the phylogenetic analysis suggest that there is only one form of the enzyme, like in other teleosts. Protein sequence alignments further showed that the SF MAO is 95% identical to zebrafish MAO, and 79%/78% identical to mouse MAOa/b, respectively, on the length of the cloned fragment. One potentially significant sequence difference between *Astyanax* CF and SF was detected: a proline to leucine substitution was observed in 5/5 independent clones of CF MAO, suggesting that the amino-acid change is fixed in the CF lineage. This substitution is located in a region of very high conservation and at a position where a leucine residue is always found in surface *Astyanax* and in all other vertebrate species examined (Fig. 4B, red arrow). Such a substitution is considered as “radical” as leucine and proline have different physico-chemical properties. Moreover, this proline to leucine radical substitution occurs in a region of the MAO protein that appears highly polymorphic in CF. Indeed, 6 polymorphic sites are present around the fixed mutation, each in one of the 5 independent clones of cavefish MAO (Fig. 4B, black arrows). The rest of the obtained sequence, including the highly conserved NAD(P)-binding Rossmann-like domain (catalytic domain; Pfam13450) was identical in the two *Astyanax* morphs (Fig. 4B, boxed).

To test whether the proline to leucine mutation in the CF MAO is responsible for its decreased enzymatic activity, we next performed site-directed mutagenesis on mouse MAO to mimic the cavefish substitution. We transfected COS cells with the obtained constructs and measured MAO activity. Compared to control and transfected COS, the activity of MAO was significantly decreased in cells transfected with mutated MAO ( $p=0.0209$ ). In fact after this mutation (Fig. 4C), MAO loses 49% of activity suggesting that the proline to leucine mutation has a strong impact on the function of this enzyme. The comparison between results of SF/CF



and control/mutated transfected COS shows that the loss of activity is proportionally similar in both case ( $p=0.3082$ ), suggesting that this mutation is sufficient to induce the difference of MAO activity between SF and CF populations.

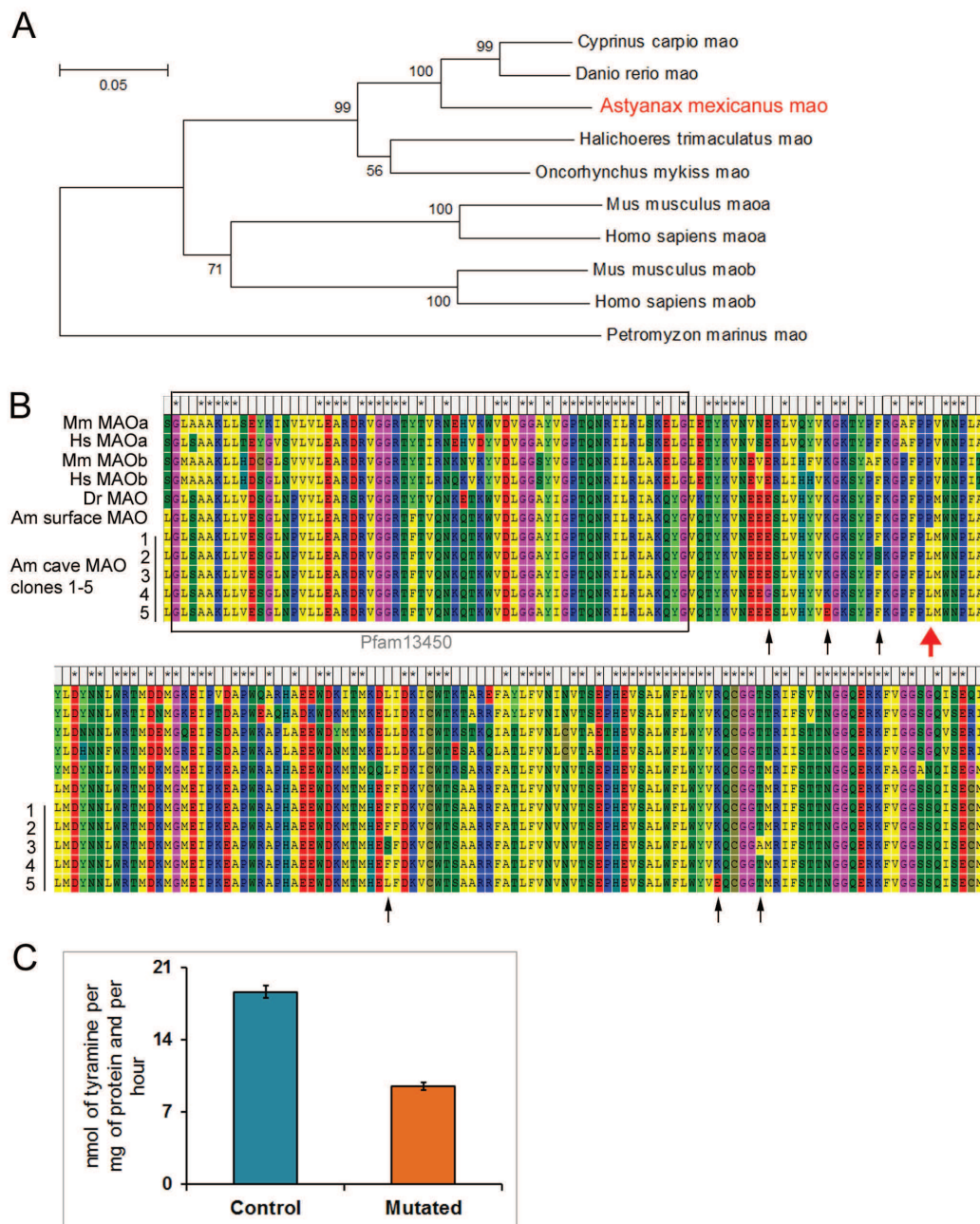


Figure 4

### MAO expression in surface fish and cavefish.

We also compared the spatio-temporal MAO expression patterns and MAO activity patterns in larval brain of SF and CF by *in situ* hybridization. The *Astyanax* MAO expression pattern was highly comparable to the condition described in larval zebrafish (Sallinen et al., 2009).





The onset of MAO expression in *Astyanax* was before 48 hpf (hours post-fertilization). In SF larvae of 48-60hpf, MAO transcripts were detected throughout the diencephalon and hypothalamus, and in discrete groups of cells in the hindbrain corresponding to raphe, locus coeruleus and internal reticular formation neurons (Fig. 5A and see below). In CF larvae of the same age, MAO expression was similar, except that no expression was detected in the reticular formation (Fig. 5B, asterisk). This differential MAO expression was correlated with presence or absence of *in situ* MAO activity in this area in SF and CF, respectively, at the same stage (Fig. 5CD). Such absence of MAO activity measured *in situ* on fresh larvae rules out the possibility that another, undiscovered, form of MAO could be expressed and active in this particular neuronal group of the CF hindbrain. One day later however, both MAO expression and MAO *in situ* activity were present in the reticular formation of CF (Fig. 5G-H). At later stages (one week, two weeks), MAO *in situ* activity became strong, widespread and diffuse throughout the ventral aspect of the brain (not shown). Thus, the onset of MAO expression and activity is similar in the two *Astyanax* morphs, although both are delayed by one day in the CF reticular formation.

### **Monoaminergic neurons in surface fish and cavefish.**

Finally, to confront neuroanatomical data with HPLC data presented earlier, we also compared the distribution and size of monoaminergic cell groups in the brains of older, one week old SF and CF larvae. Their distribution, expectedly, was identical in the two morphs (Fig. 6G-J). There were however differences in the size of some nuclei between SF and CF. More TH-positive DA cells in the telencephalon/olfactory bulbs and in one of the DA cell clusters of the hypothalamus were consistently observed in CF; the NA-ergic locus coeruleus contained more cells in CF than in SF; and, as we have previously described (Elipot et al., 2013), the anterior paraventricular 5HT nucleus of the hypothalamus was larger in CF. Together with the decreased MAO activity in the cavefish brain, these anatomical differences may account for the higher 5HT, DA and NA levels in the CF brain (Fig. 2A).



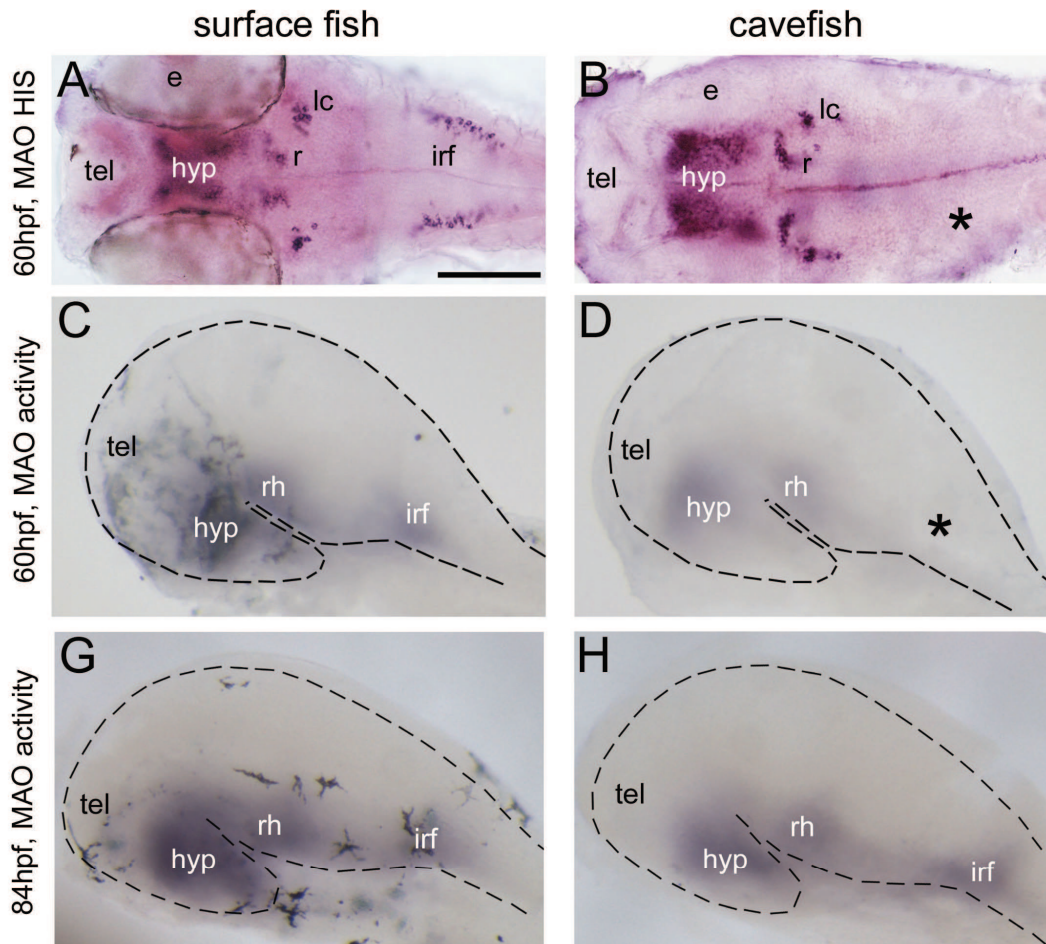


Figure 5

We also compared the developing MAO-expressing cells distribution to that of monoaminergic cells in SF and CF. To this end, immunohistochemistry for 5HT and for TH, which allows identifying DA and NA cell groups, were performed (Fig. 6A-F).



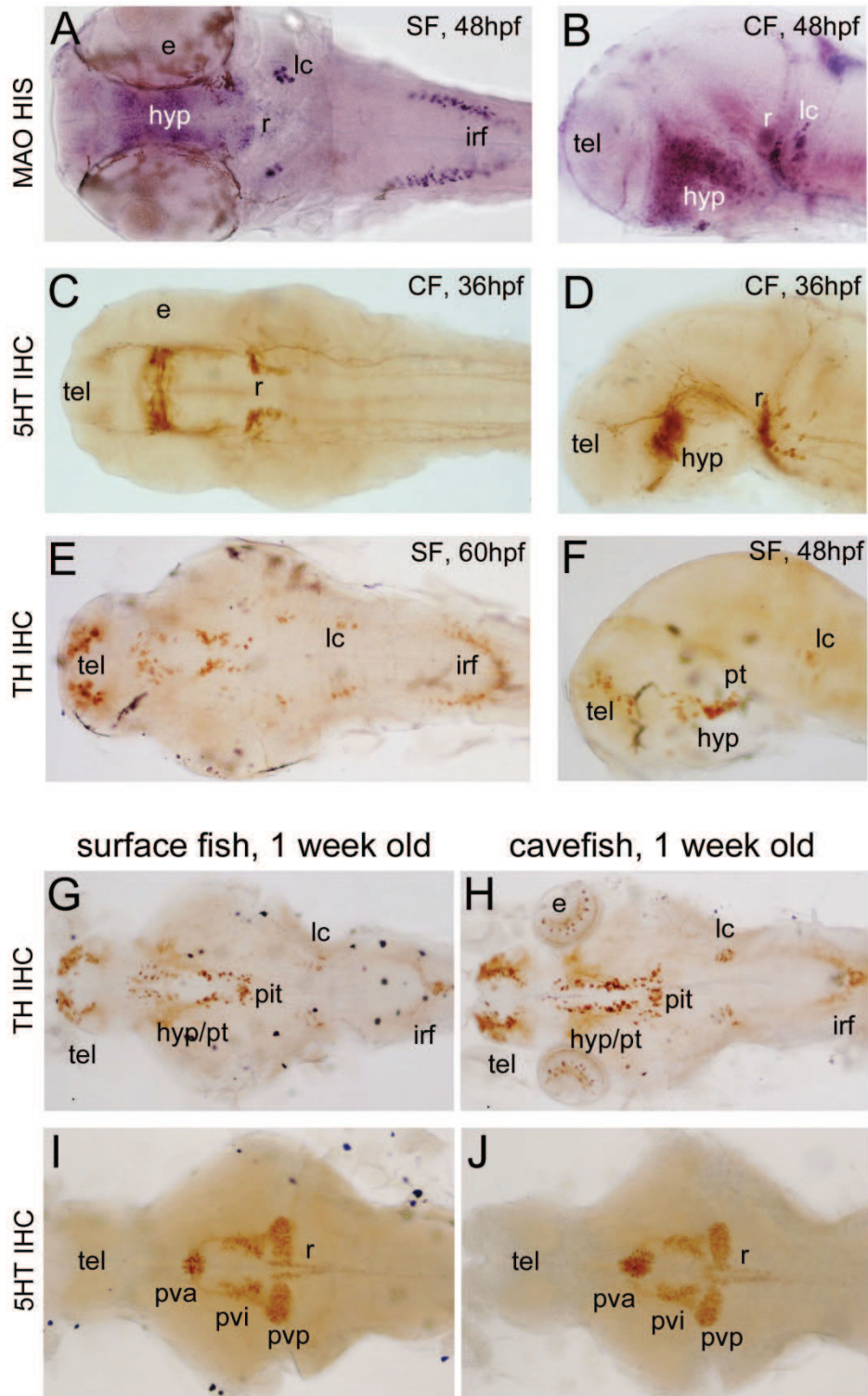


Figure 6

It appeared that all the first MAO-expressing cells in the brain exactly correspond to 5HT cells and to a subset of DA and NA cells (Fig. 6A-F). Among those aminergic cells that do not express MAO at the larval stages examined are the differentiated TH-positive DA cells of the telencephalon and olfactory bulb (compare Fig. 6AB with Fig. 6EF).



## Discussion

We have compared the biochemical and neuroanatomical profiles of *Astyanax* surface fish and cavefish brains for the main monoaminergic (serotonergic and catecholaminergic) systems. The different levels of analysis converge on the idea that cave morphs present a “hyper” monoaminergic phenotype: their brain levels of 5HT, DA and NA neurotransmitters are higher than in surface morphs. This phenotype results from multiple modifications, including changes in the fine neuroanatomy of monoaminergic nuclei, mainly affecting their size, and the molecular evolution of the MAO sequence, affecting its enzymatic activity. Strikingly, all these changes observed in cavefish, either constructive/gains (e.g., more neurons in some nuclei) or negative/losses (e.g., a mutation in MAO that decreases its activity) contribute to an enhancement of monoaminergic neurotransmission in cavefish.

### **The *Astyanax*/teleost fish monoaminergic catabolism is different from mammals.**

To our knowledge, this report is one of the first examining in depth the monoaminergic biochemical profile in a teleost brain. In our model species *Astyanax*, two features were strikingly different from what is largely reported in mammals including humans. (1) Detectable, relatively high (between 1000 and 2000 fmol per mg brain tissue) levels of adrenalin were found in the *Astyanax* brain, whereas this compound is exclusively detected at the periphery in mammals in normal conditions. This suggests that the PNMT pathway which converts NA into Adr is very active in this fish brain. (2) Conversely, the levels of the final metabolite VMA were undetectable in the fish brain, suggesting that MAO and COMT are not actively degrading NA and Adr. (3) Deprenyl treatments suggested that NA is a very poor substrate for the MAO enzyme and is not degraded through this pathway. Altogether, these data led us to propose that in the *Astyanax* brain, the PNMT pathway is the degradation pathway for NA, and that Adr may actually rather correspond to the final metabolite of NA (and, indirectly, DA) but not to a neurotransmitter per se.

Most of what is currently known on monoamine metabolism in fish comes from the zebrafish model. In this species also, MAO displays strong affinity for 5HT but a modest one for DA, and it is inhibited by clorgyline and deprenyl (Anichtchik et al., 2006). In larval zebrafish, Sallinen et al. have reported that inhibition of MAO by deprenyl strongly increased 5-HT but





not DA and NA levels (Sallinen et al., 2009). Thus, the zebrafish (a cypriniform) and the *Astyanax* (a characiform) conditions appear very similar. It is tempting to propose that these shared fish modalities are linked to the fact that all teleost species tested so far have only one MAO in their genome.

The two mammalian MAO isoforms are distinguished by their differential affinity for substrates and inhibitors. MAOa deaminates 5HT and NA, while MAOb deaminates  $\beta$ -phenylethylamine and benzylamine, and also DA in humans (Glover et al., 1977). In *Astyanax*, we have found that the single MAO enzyme effectively deaminates any type of substrate, therefore recapitulating MAOa+b types of activities. On the other hand, clorgyline and deprenyl are considered as selective inhibitors of mammalian MAO a and b, respectively (Sullivan et al., 1986). These two compounds successfully inhibit zebrafish MAO (Anichtchik et al., 2006), and deprenyl is efficient as well on *Astyanax* MAO, suggesting again an absence of inhibitor specificity for the fish's MAO. Finally, sequence-wise, the fish MAO does not clearly correspond to one or the other of the mammalian isoforms (Fig. 4A). Indeed, the MAO phylogenetic tree strongly suggests a gene duplication in the mammalian lineage, which was probably followed by sub-functionalisation and/or acquisition of new functions for the two paralogs. Taken altogether, we propose that the presence of only one MAO form in the catabolism pathway of the monoamines in *Astyanax* (and probably other fishes) imposes some peculiarities to these neurotransmitter systems: 5HT appears like the almost exclusive substrate of MAO, and the PNMT activity converting NA>Adr is used as a catabolic pathway for catecholamines.

### **A “hyper” monoaminergic phenotype in cavefish.**

Our hypothesis of a hyper-monoaminergic phenotype in CF stems from two types of independent evidences. First, 5HT, DA and NA levels are higher and their metabolite/neurotransmitter ratios are lower in the cavefish brain, highlighting a stronger neurotransmission index. This difference between the two morphs is mainly due to a reduced MAO activity in cavefish, but we cannot exclude effects resulting from synthesis differences as well, that may have to be investigated further. Second, we report subtle but clear differences in the sizes of several monoaminergic nuclei throughout the cavefish brain when compared to surface counterparts. Concerning 5HT, the raphe size is identical in SF and CF, but the PVa nucleus is bigger in CF (see also (Elipot et al., 2013)). Concerning DA, the



central hypothalamic DA cluster and the telencephalic and olfactory bulb DA cells are more numerous in CF. And concerning NA, the locus coeruleus harbors more cells in CF. We can suppose that both decreased MAO activity and increased cell numbers contribute to the higher monoamine brain levels in CF, and it would actually be difficult to discriminate between the two convergent effects. It is also interesting to note that all the quantitative effects we observed after HPLC measurements and ratio calculations were especially robust in the forebrain part of the samples, where many neuronal nuclei but also extensive fiber projection systems reside (see Methods and Suppl Fig.).

The fixed amino-acid substitution that we discovered in the cave MAO appears like a partial loss of function mutation. The high number of SNPs surrounding this fixed mutation suggests that this region of the protein is unstable and prone to mutations (and rapid evolution?) in the cavefish lineage. This would correspond to the “molecular evolution” component of the change in monoamine transmission in cavefish.

On the other hand the increased numbers of cells in some nuclei appear like gain of function phenotypes. In the case of the PVa, we have recently shown that the change of size of this particular nucleus in cavefish is due to early developmental signaling and timing differences during embryogenesis of the two morphs (Elipot et al., 2013). It is probable, but actual experimental demonstration is needed, that the same types of mechanisms will underlie the differences observed in other DA and NA cell groups between SF and CF. These changes would correspond to the “developmental evolution” component of the change in monoamine transmission in cavefish.

Strikingly, the loss of function/molecular evolution and the gain of function/developmental evolution components of the changes observed in cavefish both contribute to an enhancement of monoaminergic neurotransmission in cavefish. This may suggest that the CF hyper-monoaminergic phenotype could be adaptive for life in cave environment.

### **Functional and behavioral correlates of the modified monoaminergic system in cavefish?**

As explained in the introduction, we have studied monoamines in *Astyanax* SF and CF brains because these neurotransmitter systems seemed relevant to the known behavioral differences existing between the two morphs. Some of these correlations are listed below:



- (1) A bigger locus coeruleus and higher NA brain levels in CF can be related to their reported loss of sleep (Duboue et al., 2011). Consistently, the same group has reported that a blockade of  $\alpha$ 1-adrenergic receptors rescues sleep in CF (Duboue et al., 2012), indeed involving the NA system in this striking behavioral peculiarity.
- (2) The MAO mutation and decreased MAO activity in CF may actually constitute part of the molecular basis for the loss of aggressive behavior we have recently analyzed in cavefish (Elipot et al., 2013; Rétaux and Elipot, 2013). Indeed, we have proposed that the lack of hierarchical aggressive behavior in cavefish could be due to their inability to down-regulate their raphe 5HT levels -a phenomenon that does occur in the raphe nucleus of dominant, aggressive, surface fish. Reduced MAO activity condemns CF to have relatively high raphe 5HT levels, a condition that corresponds to subordinate surface fish.
- (3) In the same line, increased 5HT and DA neurotransmission are relevant to the reported CF increased foraging behavior (cb) and behavioral drive for food (hypothesis in (Strickler and Soares, 2011)). DA may as well play a role in what we would describe as a sort of “addiction” to food, or in reward to food finding, in CF.
- (4) All cave-dwelling animals are blind and de-pigmented. Their pigmentation loss is due to a convergent defect in the first step of melanin biosynthesis (Bilandzija et al., 2013). In *Astyanax* cavefish, *Oca2* is mutated (Protas et al., 2006), while in insects, an unknown factor is affected (Bilandzija et al., 2013). The consequence of these blockades in melanin synthesis is therefore the same in diverse animal phyla: L-tyrosine, the precursor for the melanin synthesis pathway, is not metabolized. As tyrosine is also the precursor of DA and NA, do high amounts of available L-tyrosine have a role in the high DA and NA contents of the CF brain?

## Conclusion

The hyper-monoaminergic phenotype we report in the *Astyanax* cavefish brain appears relevant to the understanding of some of the behavioral and neurophysiological particularities of these fascinating animals. This phenotype probably arises through both molecular and developmental evolutionary mechanisms, suggesting some selective pressure on the system. Of note, the cavefish monoaminergic condition, including high neurotransmission indexes and a mutation in their MAO enzyme, would probably be considered strongly pathological in humans, yet they thrive in their caves since about one million years.



## Acknowledgements.

We thank Stéphane Père and Magalie Bouvet for taking care of our *Astyanax* colony, and FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) for financial support to YE towards the end of his PhD. Work supported by ANR (Agence Nationale pour la Recherche) grants [ASTYCO] and [BLINDTEST] to SR.

## Figure legends

### Figure 1: Schema of the principal synthesis and degradation pathways for monoamines studied in this paper.

Emphasis is given on the compounds and enzymes studied. A green circle indicates the molecules analyzed by HPLC. The color code is given in the inset.

### Figure 2: HPLC measurements of monoamines and metabolites in *Astyanax* SF and CF.

**A**, HPLC measurements of indicated monoamines in whole brains of SF (blue) and CF (red).

**B**, HPLC measurements of indicated monoamine metabolites in whole brains of SF (blue) and CF (red).

**C**, calculated metabolite/monoamine ratios in SF (blue) and CF (red).

### Figure 3: MAO activity in *Astyanax*.

**A**, MAO enzymatic activity measurements using indicated substrates in whole brains of SF (blue) and CF (red).

**B**, HPLC measurements of indicated compounds after deprenyl (10 $\mu$ M) treatment in whole brains of SF (blue: control; dark blue: deprenyl) and CF (red: control; dark red: deprenyl).

### Figure 4: *Astyanax mexicanus* surface fish and cavefish MAO sequence analysis.

**A**, Phylogenetic tree (NJ) showing the relationships between *Astyanax* and other vertebrates MAO sequences. Bootstrap values are indicated.

*Cyprinus carpio*: carp. *Danio rerio*: zebrafish. *Halichoeres trimaculatus*: threespot wrasse. *Oncorhynchus mykiss*: trout. *Petromyzon marinus*: marine lamprey.





**B**, Alignment of 207 amino-acids between mammalian MAOa/b, zebrafish MAO, and *Astyanax* surface fish and cavefish MAOs. The boxed area is the putative catalytic domain, a red arrow indicates a fixed substitution between surface and cave forms of MAO, and black arrows point to polymorphic sites in cavefish MAO.

Mm, *Mus musculus*; Hs, *Homo sapiens*; Dr, *Danio rerio*; Am, *Astyanax mexicanus*.

**Figure 5: *In situ* expression and activity of MAO in *Astyanax* SF and CF larval brains.**

**A-B**, *In situ* hybridization for MAO mRNA on ventral view (A) and lateral view (B) of dissected brains of 60 hpf SF (left) and CF (right) larvae. Anterior is left.

**C-D**, *In situ* MAO activity revealed on whole 60 hpf larvae brains pictured on lateral views. Anterior is left and dorsal is up. Note that the intensity of staining is higher in SF brain, suggesting a higher MAO activity *in situ* that parallels the higher activity *in vitro*.

In B and D, an asterisk points to the absence of MAO expression and activity in the internal reticular formation of cavefish.

**G-H**, *In situ* MAO activity revealed on whole 84 hpf larvae brains pictured on lateral views. Anterior is left and dorsal is up.

Abbreviations: E, eye; Hyp, hypothalamus; Irf, internal reticular formation; Lc, locus coeruleus; R, raphe nucleus; Rh, rhombencephalon; Tel, telencephalon

**Figure 6: Neuroanatomy of MAO-positive and monoamine-containing cells in *Astyanax*.**

**A-B**, *In situ* hybridization (HIS) for MAO mRNA on ventral view (A) and lateral view (B) of dissected brains of 48 hpf larvae, as indicated. Anterior is left.

**C-D**, Immunohistochemistry (IHC) for 5HT on ventral view (C) and lateral view (D) of dissected brains of 36 hpf larvae, as indicated.

**E-F**, Immunohistochemistry (IHC) for TH on ventral view (E) and lateral view (F) of dissected brains of 48 and 60 hpf larvae, as indicated.

**G-J**, Immunohistochemistry (IHC) for TH and 5HT for anatomical comparison on ventral views from one week old SF (left) and CF (right).

Abbreviations: E, eye; Hyp, hypothalamus; Irf, internal reticular formation; Lc, locus coeruleus; Pit, pituitary; Pt, posterior tuberculum; Pva, pvi, pvp, anterior, intermediate and posterior paraventricular nucleus of the hypothalamus; R, raphe nucleus; Rh, rhombencephalon; Tel, telencephalon.



## References

- Anichtchik, O., Sallinen, V., Peitsaro, N., and Panula, P. (2006). Distinct structure and activity of monoamine oxidase in the brain of zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* 498, 593-610.
- Bellipanni, G., Rink, E., and Bally-Cuif, L. (2002). Cloning of two tryptophan hydroxylase genes expressed in the diencephalon of the developing zebrafish brain. *Gene Expr Patterns* 2, 251-256.
- Berlin, I., Said, S., Spreux-Varoquaux, O., Olivares, R., Launay, J.M., and Puech, A.J. (1995). Monoamine oxidase A and B activities in heavy smokers. *Biological psychiatry* 38, 756-761.
- Bilandzija, H., Cetkovic, H., and Jeffery, W.R. (2013). Evolution of albinism in cave planthoppers by a convergent defect in the first step of melanin biosynthesis. *Evolution & development* 14, 196-203.
- Bonhomme, N., and Esposito, E. (1998). Involvement of serotonin and dopamine in the mechanism of action of novel antidepressant drugs: a review. *J Clin Psychopharmacol* 18, 447-454.
- Brunner, H.G., Nelen, M., Breakefield, X.O., Ropers, H.H., and van Oost, B.A. (1993). Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science (New York, NY)* 262, 578-580.
- Burchards, H., Dölle, A., and Parzefall, J. (1985). Aggressive behavior of an epigeal population of *Astyanax mexicanus* and some observations on three subterranean populations. *Behav Processes* 11, 225-235.
- Candy, J., and Collet, C. (2005). Two tyrosine hydroxylase genes in teleosts. *Biochim Biophys Acta* 1727, 35-44.
- Chen, K., Wu, H.F., Grimsby, J., and Shih, J.C. (1994). Cloning of a novel monoamine oxidase cDNA from trout liver. *Mol Pharmacol* 46, 1226-1233.
- Denney, R.M., Fritz, R.R., Patel, N.T., and Abell, C.W. (1982). Human liver MAO-A and MAO-B separated by immunoaffinity chromatography with MAO-B-specific monoclonal antibody. *Science (New York, NY)* 215, 1400-1403.
- Deyts, C., Candal, E., Joly, J.S., and Bourrat, F. (2005). An automated in situ hybridization screen in the Medaka to identify unknown neural genes. *Dev Dyn* 234, 698-708.
- Duboue, E.R., Borowsky, R.L., and Keene, A.C. (2012). beta-Adrenergic Signaling Regulates Evolutionarily Derived Sleep Loss in the Mexican Cavefish. *Brain Behav Evol.*
- Duboue, E.R., Keene, A.C., and Borowsky, R.L. (2011). Evolutionary convergence on sleep loss in cavefish populations. *Curr Biol* 21, 671-676.
- Edmondson, D.E., Mattevi, A., Binda, C., Li, M., and Hubalek, F. (2004). Structure and mechanism of monoamine oxidase. *Curr Med Chem* 11, 1983-1993.
- Ekstrom, P., Nyberg, L., and van Veen, T. (1985). Ontogenetic development of serotonergic neurons in the brain of a teleost, the three-spined stickleback. An immunohistochemical analysis. *Brain Res* 349, 209-224.
- Ekstrom, P., and Van Veen, T. (1984). Distribution of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in the brain of the teleost *Gasterosteus aculeatus* L. *J Comp Neurol* 226, 307-320.
- Elipot, Y., Hinaux, H., Callebert, J., and Rétaux, S. (2013). Evolutionary shift from fighting to foraging in blind cavefish through changes in the serotonin network. *Current Biology.*



- Espinasa, L., Yamamoto, Y., and Jeffery, W.R. (2005). Non-optical releasers for aggressive behavior in blind and blinded *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Behav Processes* 70, 144-148.
- Filippi, A., Mahler, J., Schweitzer, J., and Driever, W. (2010). Expression of the paralogous tyrosine hydroxylase encoding genes *th1* and *th2* reveals the full complement of dopaminergic and noradrenergic neurons in zebrafish larval and juvenile brain. *J Comp Neurol* 518, 423-438.
- Glover, V., Sandler, M., Owen, F., and Riley, G.J. (1977). Dopamine is a monoamine oxidase B substrate in man. *Nature* 265, 80-81.
- Grimsby, J., Chen, K., Wang, L.J., Lan, N.C., and Shih, J.C. (1991). Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 3637-3641.
- Grimsby, J., Lan, N.C., Neve, R., Chen, K., and Shih, J.C. (1990). Tissue distribution of human monoamine oxidase A and B mRNA. *J Neurochem* 55, 1166-1169.
- Hinaux, H., Pottin, K., Chalhoub, H., Pere, S., Elipot, Y., Legendre, L., and Retaux, S. (2011). A developmental staging table for *Astyanax mexicanus* surface fish and Pachon cavefish. *Zebrafish* 8, 155-165.
- Hoyer, D., Hannon, J.P., and Martin, G.R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71, 533-554.
- Jeffery, W.R. (2008). Emerging model systems in evo-devo: cavefish and microevolution of development. *Evolution & development* 10, 265-272.
- Jeffery, W.R. (2009). Chapter 8. Evolution and development in the cavefish *Astyanax*. *Curr Top Dev Biol* 86, 191-221.
- Kokel, D., Bryan, J., Laggner, C., White, R., Cheung, C.Y., Mateus, R., Healey, D., Kim, S., Werdich, A.A., Haggarty, S.J., *et al.* (2010). Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. *Nat Chem Biol* 6, 231-237.
- Kokel, D., and Peterson, R.T. (2011). Using the zebrafish photomotor response for psychotropic drug screening. *Methods Cell Biol* 105, 517-524.
- Kopin, I.J. (1994). Monoamine oxidase and catecholamine metabolism. *J Neural Transm Suppl* 41, 57-67.
- Kumazawa, T., Seno, H., Ishii, A., Suzuki, O., and Sato, K. (1998). Monoamine oxidase activities in catfish (*Parasilurus asotus*) tissues. *J Enzyme Inhib* 13, 377-384.
- Lillesaar, C. (2011). The serotonergic system in fish. *J Chem Neuroanat* 41, 294-308.
- Lillesaar, C., Stigloher, C., Tannhauser, B., Wullmann, M.F., and Bally-Cuif, L. (2009). Axonal projections originating from raphe serotonergic neurons in the developing and adult zebrafish, *Danio rerio*, using transgenics to visualize raphe-specific *pet1* expression. *J Comp Neurol* 512, 158-182.
- Lin, Z., Canales, J.J., Bjorgvinsson, T., Thomsen, M., Qu, H., Liu, Q.R., Torres, G.E., and Caine, S.B. (2011). Monoamine transporters: vulnerable and vital doorkeepers. *Prog Mol Biol Transl Sci* 98, 1-46.
- Lin, Z., and Madras, B.K. (2006). Human genetics and pharmacology of neurotransmitter transporters. *Handb Exp Pharmacol*, 327-371.
- Ma, P.M. (2003). Catecholaminergic systems in the zebrafish. IV. Organization and projection pattern of dopaminergic neurons in the diencephalon. *J Comp Neurol* 460, 13-37.
- Millan, M.J., Marin, P., Bockaert, J., and Mannoury la Cour, C. (2008). Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends Pharmacol Sci* 29, 454-464.
- Neve, K.A., Seamans, J.K., and Trantham-Davidson, H. (2004). Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res* 24, 165-205.



Nicotra, A., and Senatori, O. (1989). Some characteristics of mitochondrial monoamine oxidase activity in eggs of carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp Biochem Physiol C* 92, 401-404.

Norton, W., and Bally-Cuif, L. (2010). Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC Neurosci* 11, 90.

Panula, P., Chen, Y.C., Priyadarshini, M., Kudo, H., Semenova, S., Sundvik, M., and Sallinen, V. (2010). The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiol Dis* 40, 46-57.

Pottin, K., Hyacinthe, C., and Retaux, S. (2010). Conservation, development, and function of a cement gland-like structure in the fish *Astyanax mexicanus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 17256-17261.

Protas, M.E., Hersey, C., Kochanek, D., Zhou, Y., Wilkens, H., Jeffery, W.R., Zon, L.I., Borowsky, R., and Tabin, C.J. (2006). Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. *Nat Genet* 38, 107-111.

Rétaux, S., and Elipot, Y. (2013). Feed or fight: a behavioral shift in blind cavefish. *Communicative and Integrative Biology* 6, e23166.

Ryu, S., Holzschuh, J., Mahler, J., and Driever, W. (2006). Genetic analysis of dopaminergic system development in zebrafish. *J Neural Transm Suppl*, 61-66.

Sallinen, V., Sundvik, M., Reenila, I., Peitsaro, N., Khrustalyov, D., Anichtchik, O., Toleikyte, G., Kaslin, J., and Panula, P. (2009). Hyperserotonergic phenotype after monoamine oxidase inhibition in larval zebrafish. *J Neurochem* 109, 403-415.

Scholl, J.L., Renner, K.J., Forster, G.L., and Tejani-Butt, S. (2010). Central monoamine levels differ between rat strains used in studies of depressive behavior. *Brain Res* 1355, 41-51.

Senatori, O., Nicotra, A., and Scopelliti, R. (1990). Monoamine oxidase activity in embryos of pike (*Esox lucius*). *Comp Biochem Physiol C* 96, 87-90.

Setini, A., Pierucci, F., Senatori, O., and Nicotra, A. (2005). Molecular characterization of monoamine oxidase in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 140, 153-161.

Shih, J.C., Chen, K., and Ridd, M.J. (1999). Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annu Rev Neurosci* 22, 197-217.

Strickler, A.G., and Soares, D. (2011). Comparative genetics of the central nervous system in epigeal and hypogeal *Astyanax mexicanus*. *Genetica* 139, 383-391.

Sullivan, J.P., McDonnell, L., Hardiman, O.M., Farrell, M.A., Phillips, J.P., and Tipton, K.F. (1986). The oxidation of tryptamine by the two forms of monoamine oxidase in human tissues. *Biochemical pharmacology* 35, 3255-3260.

Windsor, S., Paris, J., and de Perera, T.B. (2011). No role for direct touch using the pectoral fins, as an information gathering strategy in a blind fish. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 197, 321-327.

Windsor, S.P., Norris, S.E., Cameron, S.M., Mallinson, G.D., and Montgomery, J.C. (2010a). The flow fields involved in hydrodynamic imaging by blind Mexican cave fish (*Astyanax fasciatus*). Part I: open water and heading towards a wall. *J Exp Biol* 213, 3819-3831.

Windsor, S.P., Norris, S.E., Cameron, S.M., Mallinson, G.D., and Montgomery, J.C. (2010b). The flow fields involved in hydrodynamic imaging by blind Mexican cave fish (*Astyanax fasciatus*). Part II: gliding parallel to a wall. *J Exp Biol* 213, 3832-3842.

Windsor, S.P., Tan, D., and Montgomery, J.C. (2008). Swimming kinematics and hydrodynamic imaging in the blind Mexican cave fish (*Astyanax fasciatus*). *J Exp Biol* 211, 2950-2959.





- Yamamoto, K., Ruuskanen, J.O., Wullimann, M.F., and Vernier, P. (2010). Two tyrosine hydroxylase genes in vertebrates New dopaminergic territories revealed in the zebrafish brain. *Mol Cell Neurosci* 43, 394-402.**
- Yamamoto, K., Ruuskanen, J.O., Wullimann, M.F., and Vernier, P. (2011). Differential expression of dopaminergic cell markers in the adult zebrafish forebrain. *J Comp Neurol* 519, 576-598.**
- Zhu, Q.S., Grimsby, J., Chen, K., and Shih, J.C. (1992). Promoter organization and activity of human monoamine oxidase (MAO) A and B genes. *J Neurosci* 12, 4437-4446.**



## II.3 Discussion

Les CF semblent présenter un phénotype « hyper-aminergique » comparés aux SF. Les concentrations de sérotonine, de dopamine et de noradrénaline sont plus importantes chez les CF alors que leurs concentrations de métabolites sont identiques ou plus faibles. De plus, les ratios des concentrations métabolite/neuromédiateur étant systématiquement plus faibles chez les CF suggèrent que la neurotransmission aminergique est globalement plus active chez ces individus.

La concentration d'adrénaline est plus forte chez les SF. Le phénotype « hyper-aminergique » semble en contradiction avec ce résultat. Le VMA n'étant pas détectable dans le cerveau des *Astyanax*, il semble que l'adrénaline et la noradrénaline ne soient pas dégradées par les enzymes COMT et MAO. De plus, comparées à celles des mammifères, les concentrations des métabolites de la dopamine sont relativement faibles chez l'*Astyanax*. Par ailleurs, l'inhibition de l'activité de la monoamine oxydase par le déprenyl ne modifie pas les taux de noradrénaline et de dopamine. Nous émettons l'hypothèse que la noradrénaline n'est pas dégradée sous forme de VMA mais probablement en adrénaline. Dans ce cas, l'adrénaline n'a pas de fonction de neurotransmission dans le cerveau de l'*Astyanax* (comme chez les mammifères) mais elle est probablement un métabolite, à savoir le produit de la dégradation de la noradrénaline. Cette hypothèse renforce l'explication du phénotype « hyper-aminergique » des CF et permet d'expliquer à la fois l'absence de VMA dans les échantillons dosés et les fortes concentrations d'adrénaline, normalement non dosables chez les mammifères (Jacques Callebert, communication personnelle). Il est probable que l'activité de la phénylétholamine-N-méthyltransférase (PNMT), enzyme permettant la formation de l'adrénaline à partir de la noradrénaline, soit particulièrement active chez l'*Astyanax*.

Ce phénotype n'est pas induit par une augmentation de l'activité des enzymes de synthèse, l'activité des TH et des Tph étant similaire chez les SF et les CF. D'un point de vue neuroanatomique, on retrouve une « augmentation » des systèmes aminergiques chez les CF. Au niveau du système sérotoninergique, on observe une augmentation de la taille du noyau



paraventriculaire avec une augmentation du nombre de neurones 5HT le constituant (Elipot et al., 2013; Rétaux and Elipot, 2013). Au niveau des systèmes catécholaminergiques, les immuno-histochimies anti-TH montrent que les CF présentent une amplification du nombre de neurones dopaminergiques dans les bulbes olfactifs ainsi que dans un noyau de l'hypothalamus. Le nombre de neurones noradrénergiques du *locus ceruleus* est aussi augmenté. De plus, l'analyse de l'activité *in situ* de la MAO ainsi que les hybridations *in situ* de ce gène ont permis de découvrir une hétérochronie de l'expression et de l'apparition de l'activité MAO au niveau de la formation réticulée interne, celles-ci apparaissant plusieurs heures plus tard chez les larves de CF. Cette hétérochronie est peut être à l'origine de modifications développementales des circuits neuronaux dans cette région.

En revanche, le phénotype « hyper-aminergique » des CF est en partie induit par une diminution de l'activité catalytique. C'est le cas de la monoamine oxydase. En l'absence du génome de notre poisson, on peut supposer que, comme chez tous les téléostéens étudiés, il n'y a qu'une seule MAO chez le poisson (alors que les mammifères en possèdent deux). De fait, l'analyse de l'activité catalytique *in vitro* de la MAO des *Astyanax* montre que cette enzyme regroupe l'activité des MAO-A et B des mammifères. Par ailleurs, quel que soit le substrat utilisé, l'activité catalytique de la MAO des CF est beaucoup plus faible que celle des SF. Cette différence explique que les CF ont des taux deux fois moindre de 5-HIAA alors que leur concentration de sérotonine est plus élevée que ceux des SF.

L'analyse de la séquence codante de la MAO montre une mutation fixée chez l'ensemble des CF séquencés, induisant le changement de l'acide aminé proline en leucine, à proximité d'un site de liaison de Rossmann. Cette modification peut induire une perte d'activité car les propriétés physico-chimiques de ces deux acides aminés sont très différentes. Entre autre, la proline produit généralement la formation d'un angle dans la protéine. Cette mutation provoque donc probablement une altération de la structure générale de la MAO, conduisant sans doute à la perte de l'activité. Pour tester cette hypothèse, une mutagenèse dirigée a été réalisée sur les MAO-A et B de souris et analysée sur des cultures de cellules. L'analyse de l'activité *in vitro* des MAO-A et B contrôle ou mimant la mutation CF a été réalisée et montre que l'activité de la MAO est fortement affectée.



Un élément important à observer, la différence d'activité entre les cellules transfectées avec la MAO contrôle et la MAO mutée est statistiquement similaire à la différence d'activité entre les SF et les CF. Cela signifie que cette mutation a un rôle majeur dans la perte d'activité de la MAO des CF et permet d'expliquer à elle seule la différence d'activité observée chez les deux populations. En prenant en compte l'amplification du noyau sérotoninergique paraventriculaire de l'hypothalamus des CF, ces éléments expliquent l'augmentation de la neurotransmission 5HT chez cette population.

Par ailleurs, l'analyse de la concentration de mélatonine est actuellement en cours. Ces analyses sont particulièrement importantes car cette molécule est connue pour contrôler non seulement les cycles veille-sommeil mais aussi pour moduler l'activité des neurones dopaminergiques de l'hypothalamus chez la carpe *Cyprinus carpio* (Popek et al., 2005). Sachant que, chez le CF, (1) les cycles de veille/sommeil sont modifiés (Duboué et al., 2011), (2) l'activité du système dopaminergique est plus importante (analyse des ratios DOPAC/dopamine et DOPAC+HVA/dopamine), (3) l'hypothalamus est plus large en raison de l'extension du territoire d'expression de *Shh* pendant le développement, et (4) l'hypothalamus des *Astyanax* contient des neurones dopaminergiques, on peut s'attendre à observer une perturbation du système mélatoninergique chez les CF.

Pour conclure, l'ensemble des éléments présentés ici indique que les modifications de l'activité enzymatique des voies métaboliques ainsi que les variations neuroanatomiques convergent vers la formation du phénotype « hyper-aminergique » chez le cavernicole. Ce phénotype est sans doute responsable de nombreuses adaptations physiologiques et comportementales qui sont indispensables à l'adaptation à la vie cavernicole.





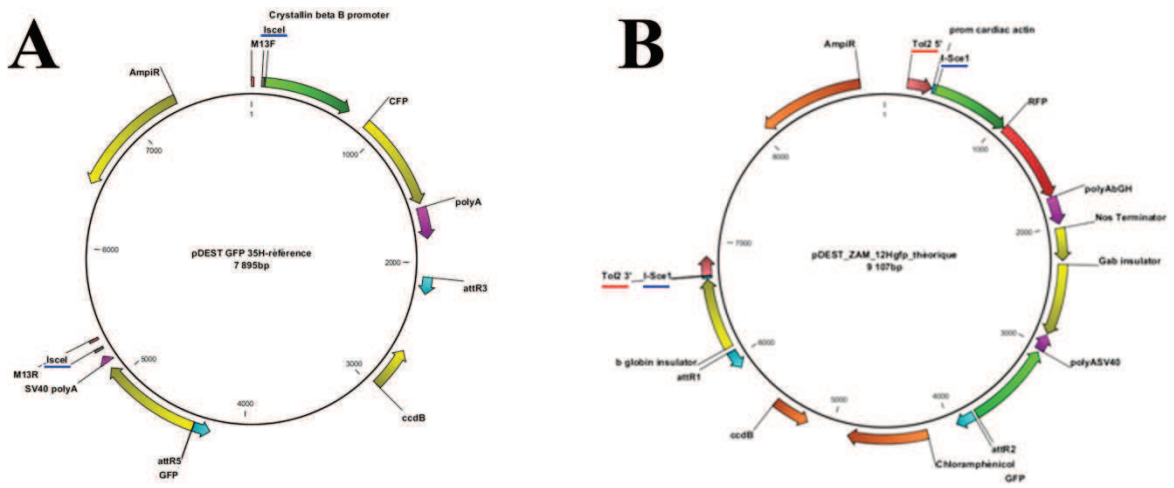
### III. Mise en place des méthodes de transgénèse chez l'*Astyanax mexicanus*

#### III.1 Présentation

Comme expliqué dans l'introduction, l'*Astyanax mexicanus* est un modèle d'étude relativement récent. Ce modèle est en pleine expansion et de plus en plus de laboratoires s'intéressent à ce poisson. Pour soutenir cette communauté et accroître la « puissance » de notre modèle, l'équipe développe de nouveaux outils. Ceci inclut la fabrication de banques d'ADNc, la mise en place d'un « *Astyanax* browser » et la publication d'une table de développement embryonnaire et larvaire (Hinaux et al., 2011, 2013). J'ai aussi collaboré pendant ma thèse avec la plateforme de transgénèse AMAGEN, et plus particulièrement avec Laurent Legendre. Nous avons utilisé les techniques de transgénèse stable utilisées généralement sur le poisson zèbre et le médaka afin de les tester et d'établir les premières lignées transgéniques chez l'*Astyanax*.

On appelle transgénèse le fait de faire entrer une séquence d'ADN dans une cellule. Cette transgénèse peut être transitoire. Dans ce cas, l'ADN exogène peut être sous différentes formes permettant l'expression de l'information génétique (plasmides, chromosomes artificiels, ...). Bien que comprenant son propre système de répllication, le vecteur est dilué et perdu lors des divisions cellulaires.

Le principe de la transgénèse stable consiste à injecter dans la cellule-œuf d'un embryon de l'ADN afin que celui-ci s'intègre au génome de la cellule. Pour Grabher le terme de transgénèse peut être employé si (1) on réalise l'introduction de gènes exogènes dans un organisme hôte, (2) on observe la transmission de ces gènes à la génération suivante (intégration du transgène dans la lignée germinale) et (3) si on observe l'expression « attendue » de ce transgène dans l'organisme hôte (Grabher et al., 2004).



**Figure 63 : Carte des vecteurs utilisés chez l'*Astyanax***

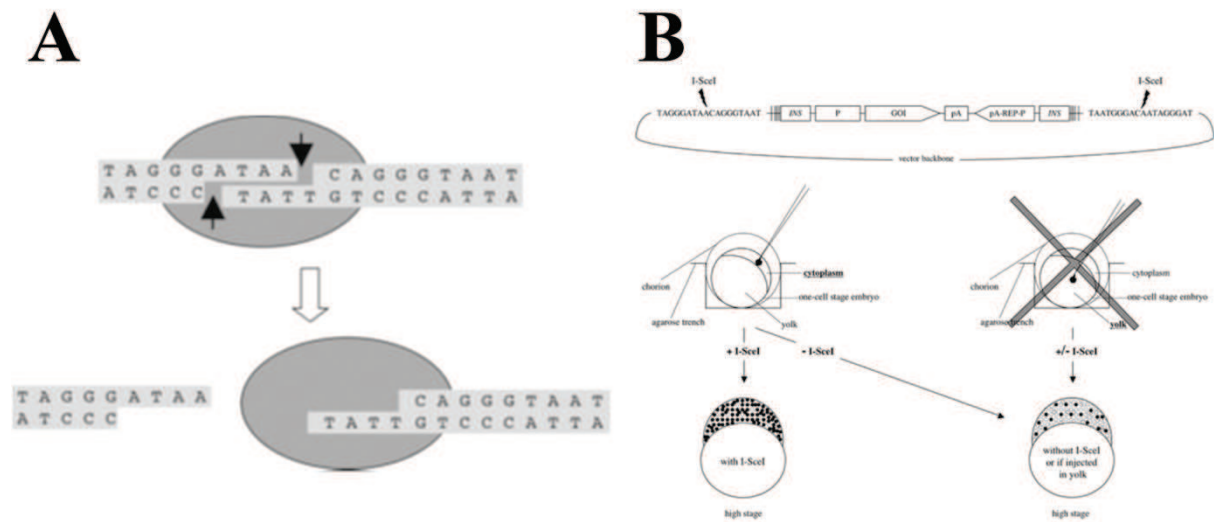
Carte génétique du vecteur pDEST-GFP (A) possédant le gène CFP sous l'influence du promoteur de la  $\beta$ -cristalline de *Danio rerio*, et du vecteur pDEST-ZAM (B), possédant le gène RFP sous l'influence du promoteur de l'actine cardiaque du *Danio rerio*. Les traits bleus indiquent les sites de reconnaissance de *I-SceI* et les traits rouges indiquent les sites de Tol2

L'animal injecté, est dit « mosaïque » car toutes ses cellules ne possèdent pas le transgène, celui-ci ne s'intégrant pas dans le génome au stade une cellule. Si une partie des cellules de la lignée germinale est transfectée alors l'individu est dit « fondateur » (ou F0) car il transmettra le transgène à une partie de sa descendance et permettra donc l'établissement d'une lignée transgénique. Tous les descendants positifs de la première génération possèdent le transgène dans toutes leurs cellules.

Cependant, lorsque de l'ADN est injecté seul dans une cellule, les mécanismes de défenses cellulaires, les nucléases, le dégradent rapidement. Le taux d'intégration dans le génome est très faible. Ce phénomène conduit à un faible taux de réussite pour la transgénèse et les animaux positifs ont un fort mosaïcisme, diminuant les chances d'obtenir des fondateurs.

L'ADN sous forme circulaire est plus stable et moins soumis à la dégradation des nucléases que la forme linéaire (les exonucléases dégradant les extrémités des séquences). Cela permet d'augmenter significativement le taux de réussite de la transgénèse. Les vecteurs qui ont été utilisés dans ce projet sont donc circulaires, comme le montre la figure 63.

Les deux vecteurs tests utilisés pour mettre en place les méthodes de transgénèse chez l'*Astyanax* sont issus de la plateforme AMAGEN. Le premier est le vecteur « pDEST-GFP » (figure 63A). Il contient, entre autres, le gène codant la protéine fluorescente bleue CFP (Cyan fluorescent protein) placé sous le contrôle du promoteur de la  $\beta$ -cristalline du *Danio rerio*. Le phénotype attendu est l'expression de la CFP dans le cristallin du poisson. Le deuxième vecteur, « pDEST-ZAM » (figure 63B), contient le gène de la protéine fluorescente rouge RFP (red fluorescent protein) mis sous le contrôle du promoteur de l'actine cardiaque du *Danio rerio*. Le phénotype attendu est l'expression de la RFP dans les muscles des alevins puis dans le cœur des poissons adultes.



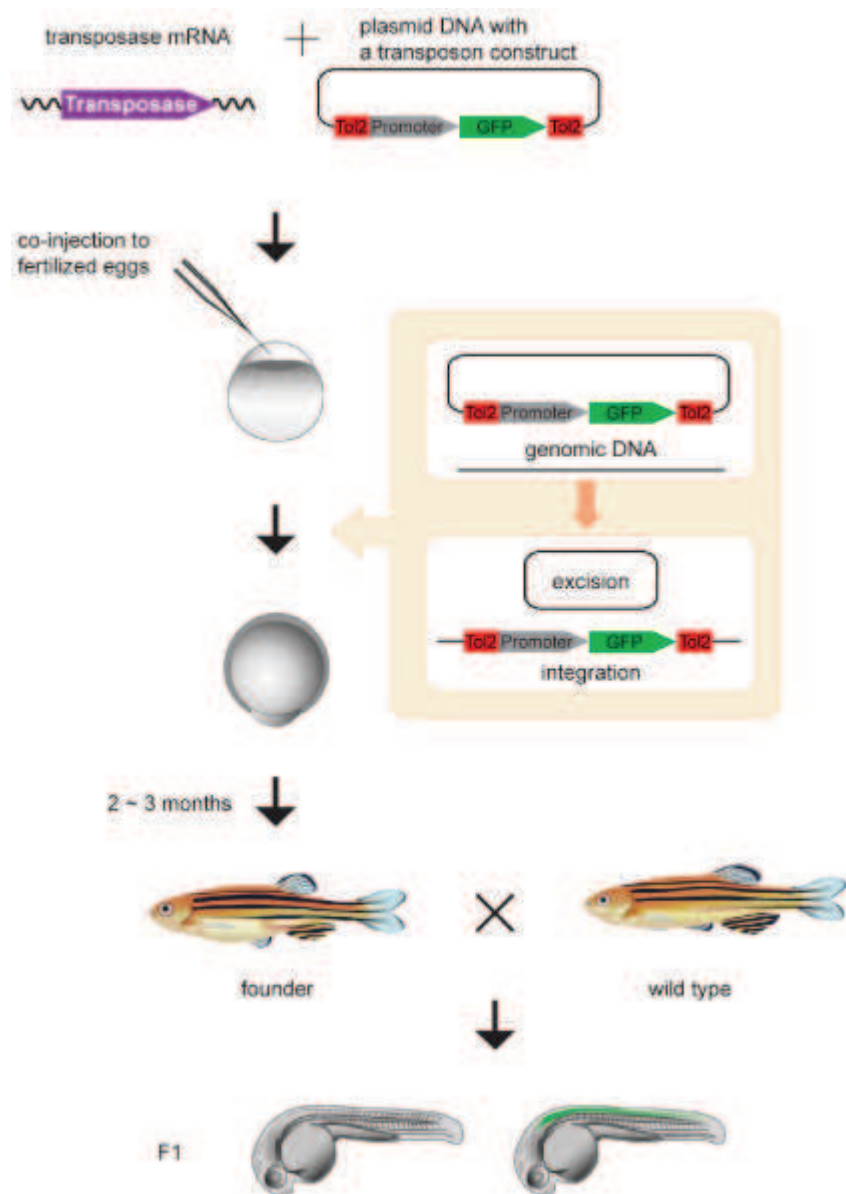
**Figure 64 : Méthode de transgénèse utilisant les méganucléases**

(A) Mécanisme de clivage de la méganucléase *I-SceI*. Lorsque l'enzyme est en contact avec sa séquence de reconnaissance, celle-ci réalise un clivage asymétrique de l'ADN (Grabher et al., 2004). (B) Représentation schématique des injections réalisées avec la technique de méganucléase. Le vecteur, qui est co-injecté avec la méganucléase, contient un site de restriction de l'enzyme de part et d'autre du transgène. Cela permet de cliver le vecteur *in vivo*, ce qui augmente la probabilité d'insertion du transgène dans le génome. Chez le poisson, l'injection doit être effectuée dans la cellule œuf (et non dans le vitellus, comme présenté à droite) et le volume injecté ne doit pas dépasser 10% du volume total de la cellule. L'utilisation d'une méganucléase associée à l'injection intracellulaire, permettent de diminuer le mosaïcisme de la F0 (les points noirs représentant les cellules contenant le transgène) et augmentent le pourcentage de chance d'obtenir des fondateurs (Grabher and Wittbrodt, 2007).

De plus, pour faciliter l'intégration de l'ADN dans le génome, d'autres éléments peuvent être co-injectés. Plusieurs techniques sont réalisables, les deux présentées ci-dessous correspondent à celles utilisées dans ce projet.

La première technique consiste à utiliser les technologies des méganucléases Involine (pour *In Vivo* Linearization). Ces enzymes sont naturellement présentes chez certains organismes tels que la levure. Elles permettent le transfert latéral entre des allèles homologues possédant ou non des introns. En fait, en réalisant des cassures doubles brins à des sites spécifiques qui sont présents uniquement dans l'allèle ne possédant pas l'intron, les méganucléases permettent une recombinaison qui provoque une modification du gène et une duplication de l'intron dans l'allèle qui en était dépourvu à l'origine (Grabher et al., 2004). La méganucléase *I-SceI* est une enzyme de restriction de type endonucléase issue de la levure *S. cerevisiae* et dont le site de reconnaissance fait 18 paires de bases (Figure 64A). Statistiquement, ce site n'est pas présent ou en un seul exemplaire dans le génome du poisson. Par contre, deux sites de restriction ont été placés dans les vecteurs, autour de la séquence d'intérêt « promoteur-gène ». Cela permet donc de linéariser *In Vivo* le vecteur et de faciliter son intégration dans le génome (figure 64B). La co-injection de *I-SceI* avec le vecteur permet d'augmenter le pourcentage d'animaux transgéniques en F0 ainsi que le pourcentage de fondateurs chez le médaka (Thermes et al., 2002) et chez le poisson zèbre (Grabher et al., 2004; Rembold et al., 2006; Soroldoni et al., 2009), en diminuant le mosaïcisme (figure 64B).

La deuxième technique est basée sur l'utilisation de transposons. Une séquence d'ADN est appelée élément transposable lorsqu'elle peut s'intégrer à une autre séquence d'ADN sans passer sous forme d'ARN (Koga, 2004). La technique de transgénèse par le transposon *Tol2* (pour Transposable element of the *Oryzias Latipes* 2) est basée sur les caractéristiques de cet élément issu du génome du Médaka *Oryzias. latipes*. Naturellement, le *Tol2* code pour une transposase et sa séquence est entourée de ITR (inverted terminal repeat) en 5' et en 3'. La protéine transposase exprimée peut reconnaître ces ITR et les couper. Les insertions du gène se produisent sur des sites préférentiels de quelques paires de bases que l'on retrouve tout au long du génome (Kawakami, 2005, 2007). Pour la transgénèse, on place le transgène souhaité dans un vecteur, sa séquence entourée de ITR



**Figure 65 : Les méthodes de transgénèse utilisant les transposons**

L'ARNm de la transposase est co-injecté avec le plasmide (contenant les séquences *Tol2* de part et d'autres du transgène). L'ARNm est traduit par la machinerie cellulaire qui synthétise l'enzyme *Tol2*. Celle-ci va exciser le transgène et faciliter son insertion dans le génome. Après le crible des animaux F0 positifs, des croisements avec des individus sauvages permettront de trouver des animaux fondateurs et de former des lignées transgéniques stables (Kawakami, 2007).

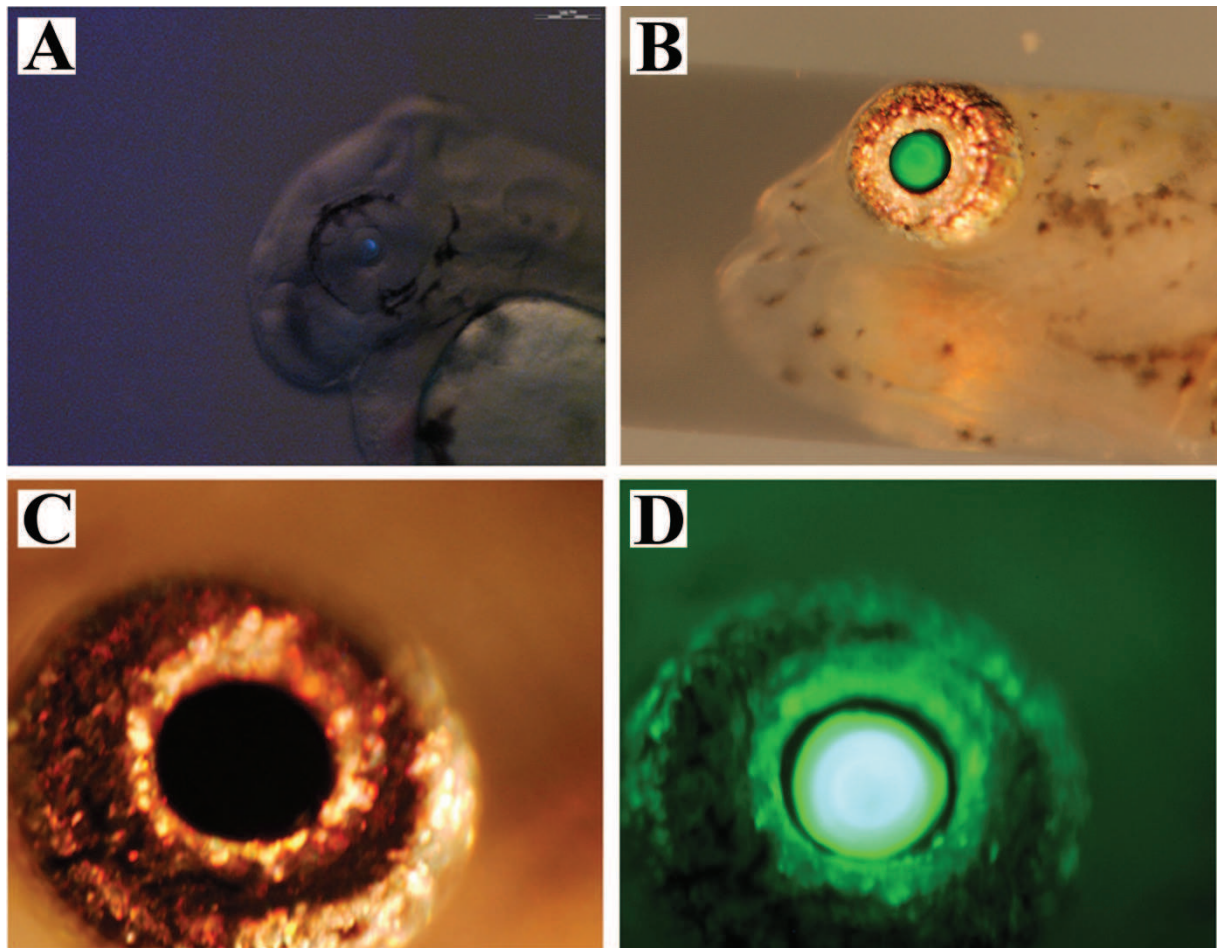
dans le vecteur. Ce vecteur est co-injecté avec l'ARN codant pour la protéine *Tol2*. La machinerie cellulaire traduit l'ARN et produit la transposase qui va exciser le transgène du vecteur pour l'insérer dans le génome de la cellule injectée (figure 65).

### III.2 Matériels et méthodes

Afin d'obtenir des œufs d'*Astyanax* de surface et cavernicole au stade une cellule, des fécondations *in vitro* sont réalisées (Borowsky, 2008b) : lorsque le banc de SF ou les CF sont excités (généralement de nuit, entre 23h et 4h), les poissons sont pêchés. Les mâles sont placés dans une boîte de Pétri et ils sont stimulés à la main. Le sperme est directement récupéré de l'orifice uro-génital à l'aide d'un capillaire. Les femelles sont ensuite placées dans une boîte de Pétri, la majorité de l'eau est retirée à l'aide d'un papier absorbant puis les femelles sont stimulées manuellement. Si la femelle pond des œufs et que ceux-ci sont matures (déterminable à l'aide d'une loupe binoculaire), le sperme est ajouté « à sec » sur les œufs. Après deux minutes, quelques millilitres d'eau sont ajoutés. Après cinq minutes, la boîte de Pétri est remplie d'eau et les œufs sont injectés avant la première division (environ 40 minutes après la fécondation).

L'injection est réalisée sous une loupe binoculaire grâce à un micromanipulateur et un système d'injection Eppendorf Femtojet. Les capillaires (Harvard Apparatus GC100-10) sont étirés à l'aide de l'étireuse Narishige pipet (modèle PP-802). Lors de l'utilisation de la méganucléase, la solution injectée est constituée d'un des deux vecteurs décrits plus haut à une concentration finale de  $15 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  et de la protéine *I-SceI* (Roche) à une concentration finale de  $1 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . Lors de l'utilisation de la transposase, la solution injectée est constituée du vecteur pDEST-ZAM à une concentration finale de  $15 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  et d'ARNm du gène *Tol2* à une concentration finale de  $8 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . Quelques picolitres sont injectés dans chaque cellule-œuf (et non dans le vitellus) comme le montre la figure 64B.





**Figure 66 : Expression du vecteur pDEST-GFP ( $\beta$  cristalline CFP) chez le SF**

Expression chez les SF injectés de la CFP dans le cristallin. Ces photos ont été prises à 24hpf (A) et à 12 jours (B, C et D).

Les taux de survie des œufs injectés et contrôles sont calculés à 24h et après une semaine. Les animaux sont criblés à l'aide d'une loupe binoculaire (Olympus SZX2-16) équipée d'un système de fluorescence (EXFO X-cite série 120-PC) une semaine après l'injection.

Dans le cas de la recherche de fondateur, le sperme des mâles F0 positifs est récupéré et utilisé pour féconder les œufs d'une femelle contrôle. Le taux de transmission est calculé en criblant les animaux une semaine plus tard. Les générations F2 et les F3 sont obtenues par croisement des animaux positifs entre eux (respectivement F1 et F2). Les femelles F0 positives ne sont pas testées car, contrairement au sperme, il est très difficile d'obtenir des œufs matures d'une femelle spécifiquement.

### III.3 Résultats et discussions

#### III.3.1 Vecteur de pDEST-GFP (promoteur $\beta$ cristalline-CFP)

Après injection du vecteur pDEST-GFP dans des œufs de SF (co-injectés avec *I-SceI*), on observe, chez certains alevins, de la fluorescence bleue au niveau du cristallin. Celle-ci est faible mais détectable à partir de 24hpf (figure 66A) et elle se renforce avec le temps (figure 66B-D). A l'inverse, aucune fluorescence n'est visible chez les alevins non injectés. Le promoteur de la  $\beta$ -cristalline du *Danio rerio* est donc bien actif chez l'*Astyanax* et s'exprime exclusivement selon le même patron d'expression chez les deux espèces.

Cependant, dans le cas d'une co-injection de pDEST-GFP et de *I-SceI* dans un œuf de CF, la fluorescence est extrêmement faible dans le cristallin à 24hpf puis disparaît ensuite. Nous pouvons supposer que l'expression de la  $\beta$ -cristalline est faible dans le cristallin en cours de dégénération. La protéine CFP n'est donc quasiment pas synthétisée, rendant difficile voire impossible le crible des animaux positifs.

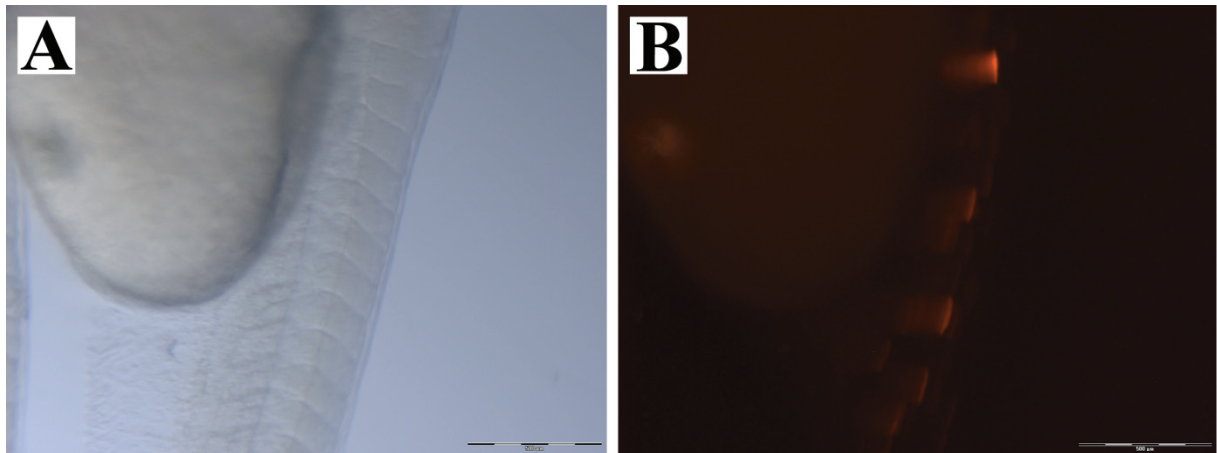


Parmi les SF F0 co-injectés avec pDEST-GFP et *I-SceI* positifs, 25 poissons ont atteint la maturité sexuelle, 12 mâles et 13 femelles. Les mâles ont été criblés et deux fondateurs ont été trouvés (soit environ 16% des poissons sont fondateurs).

Le premier fondateur transmet le transgène à 23.6% de sa descendance (N=1267). L'expression en F1 est homogène entre les individus. Le croisement des F1 entre eux permet d'obtenir 69% de positifs (N=310) avec une expression homogène entre eux. Statistiquement, l'hypothèse la plus probable est qu'il y a eu un seul site d'insertion dans le génome (Chi deux,  $p=0,0979$ ). Le croisement des F2 entre eux permet d'obtenir 77.4% de positifs (N=199) et homogènes. Par conséquent, cette lignée est stable jusqu'à au moins la F3 et elle semble n'avoir qu'un seul site d'insertion.

Le deuxième fondateur transmet le transgène à 14.6% de sa descendance (410 alevins criblés). Cependant, l'expression de la CFP n'est pas homogène entre les individus F1, suggérant que (1) il y a eu plusieurs sites d'insertion et le taux d'expression varie en fonction du nombre de copies ou (2) le transgène subit une extinction suite à des modifications épigénétiques (comme par exemple des méthylations de l'ADN). Le croisement des F1 entre eux permet d'obtenir 44.8% de positifs (N=618). Cependant, les individus F2 ont des niveaux d'expression variables selon les individus.

En comparant les résultats obtenus par auto-croisement de la F1 (44.8% de positif sur 618 alevins criblés) avec le cas théorique où il n'y a eu qu'un seul site d'insertion (75% des poissons sont théoriquement positifs), on trouve que, statistiquement, il existe une différence significative (Chi deux,  $p<0,0001$ ). Cela signifie qu'il n'y a pas un site d'insertion. Puisque le pourcentage de positifs observés est plus faible que le pourcentage théorique, on peut en déduire qu'il y a moins d'un site d'insertion. Ceci est biologiquement impossible car, des poissons positifs étant trouvés, il y a transmission du transgène. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat : (1) le transgène est toxique et provoque une mortalité des embryons positifs (avant qu'ils ne soient criblés) ou (2) des phénomènes d'extinctions par méthylation existent au sein de cette lignée et des animaux possédant le transgène n'exprime pas la CFP, ces derniers étant des « faux-négatifs ». La première hypothèse est peu probable car ; (a) les



**Figure 67 : Expression du vecteur pDEST-ZAM (actine cardiaque-RFP) chez le CF**

Expression de la RFP chez un alevin de CF injecté avec le vecteur pDEST-ZAM. Les photos ont été prises à 24hpf en lumière visible (A) ou sous lampe fluorescente (B). La barre d'échelle correspond à 500 $\mu$ m.

injections ne provoquent pas d'augmentation de la mortalité comparée aux animaux contrôles, (b) la première lignée ne présente pas ce genre de problème, (c) aucune malformation ou mortalité n'est observée chez les animaux positifs de la deuxième lignée. Par contre, la deuxième hypothèse est plus probable. Elle explique également les variations d'expressions de la CFP entre les individus de F1 et de F2. De plus, des individus F2 ayant été criblés positif au stade alevin n'expriment plus la CFP à l'âge adulte. Cela renforce l'hypothèse (2), selon laquelle la deuxième lignée est soumise à une extinction par méthylation alors que la première lignée ne semble pas y être sujette.

### III.3.2 Vecteur pDEST-ZAM (promoteur actine cardiaque-RFP)

Comme le montre la figure 67, l'injection du vecteur pDEST-ZAM induit l'expression de la RFP dans les myotomes des alevins de CF et de SF. L'expression est faible à 24hpf mais elle est bien visible à 48hpf. Aucune fluorescence n'est visible chez les alevins non-injectés. Le promoteur de l'actine cardiaque de *Danio* s'exprime donc chez les SF et les CF. Cependant, contrairement au poisson zèbre, aucune fluorescence n'est détectée au niveau cardiaque. Chez le poisson zèbre, la RFP s'exprime transitoirement dans le cœur, la fluorescence étant visible à partir des premiers battements et n'est plus détectable quelques jours plus tard. Nous pouvons supposer que cette différence est dû au fait que (1) les animaux observés sont des F0 mosaïques et que (2) les *Astyanax* étant plus gros que les poissons zèbres, l'épaisseur de chair couvrant le cœur est plus importante, empêchant la visualisation de la RFP à ce niveau.

Actuellement, 3 SF F0 positifs et 18 CF positifs sont vivants et ont atteint la maturité sexuelle. Les cribles de ces individus pour rechercher des fondateurs est en cours ainsi que de nouvelles séries d'injection.



### III.3.3 Comparaison de l'utilisation de la méganucléase *I-SceI* et de la transposase *Tol2*

Les résultats des différentes injections sont résumés dans la figure 68. Le taux de survie des œufs contrôles et injectés sont similaires dans tous les cas. Cela suggère que les vecteurs utilisés, la méganucléase *I-SceI* et l'ARN de *Tol2* ne sont pas toxiques pour l'embryon. De fait, aucune malformation n'a été observée spécifiquement sur les alevins injectés.

La comparaison du pourcentage d'animaux positifs en F0 entre *I-SceI* et *Tol2* peut être faite sur les CF injectés avec le vecteur pDEST-ZAM. Le pourcentage de positif des CF injectés avec pDEST-ZAM est de 42.4% lorsqu'il est co-injecté avec *I-SceI* (N=295 alevins criblés) et de 46.5% lorsqu'il est co-injecté avec l'ARNm de *Tol2* (N=321). Statistiquement, l'efficacité des deux méthodes est similaire (Chi deux,  $p=0,3514$ ).

Chez le poisson zèbre, le pourcentage de positifs après co-injection d'un vecteur circulaire avec *I-SceI* est de 58% (Grabher et al., 2004). Ce taux est comparable lors d'une co-injection avec *Tol2* (Frédéric Sohm, communication personnelle). Chez l'*Astyanax*, le taux de positif est également comparable entre la co-injection d'*I-SceI* et de *Tol2*, bien que légèrement plus faible que celui obtenue chez le poisson zèbre.



Vecteur	Population	Technique utilisée	Nombre d'expériences	Survie des œufs contrôles	Survie des œufs injectés	Nombre d'œufs injectés	Pourcentage d'œufs positifs
pDEST-GFP	SF	<i>IsceI</i>	3	ND	45,6 %	134	37,4 %
		<i>Tol2</i>					
	CF	<i>IsceI</i>	6	55,4 %	35,9 %	363	13,1 %
		<i>Tol2</i>					
pDEST-ZAM	SF	<i>IsceI</i>	ND	ND	ND	ND	ND
		<i>Tol2</i>	3	59,7 %	62,5 %	227	23,8 %
	CF	<i>IsceI</i>	16	47,8 %	43,7 %	1420	42,4 %
		<i>Tol2</i>	8	44,2 %	57,9 %	639	46,5 %

**Figure 68 : Récapitulatif des injections des vecteurs et des techniques de transgénèse chez les SF et les CF.**

Le vecteur pDEST-GFP ne contenant pas les séquences Tol2, ce dernier est incompatible avec la co-injection de la transposase (cellules grisées).

Abréviation : données non déterminées (ND)

### III.4 Conclusion

Ces expériences nous ont permis de confirmer que les promoteurs de la  $\beta$ -cristalline et de l'actine cardiaque de *Danio rerio* étaient actifs chez l'*Astyanax mexicanus*. En l'absence du séquençage du génome de l'*Astyanax*, avoir accès au promoteur des gènes d'intérêt est difficile. Avoir la possibilité d'utiliser les séquences de *Danio rerio*, après avoir vérifié la compatibilité du promoteur, est un atout majeur. De plus, de nombreux vecteurs ont déjà été fabriqués avec des promoteurs du poisson zèbre. Le nombre de vecteurs utilisables est donc très important. Cette compatibilité met également en évidence la haute conservation de ces régions non codantes, celles-ci pouvant être transférées d'une espèce à une autre sans perdre ou modifier leur activité.

Par ailleurs, la création des lignées de SF  $\beta$ -cristalline-CFP a permis de montrer que la technique de transgénèse par la méganucléase était compatible avec l'*Astyanax*. Bien qu'aucune lignée n'ait pu être mise en place avec *Tol2*, les résultats obtenus sur les F0 sont très encourageants. L'analyse comparative des résultats obtenus avec les CF co-injectés avec pDEST-ZAM et *I-SceI* et *Tol2* nous montre, bien que l'ARN soit plus fragile qu'une protéine, qu'il est possible d'obtenir un effet similaire à celui de la méganucléase. Il est fort probable que des fondateurs co-injectés avec *Tol2* seront trouvés parmi les animaux vivants à l'animalerie ou lors des prochaines séances d'injection.

Maintenant que ces méthodes de transgénèses ont été testées chez l'*Astyanax* et qu'elles se sont avérées fonctionnelles, ces outils seront d'une grande aide pour la communauté scientifique lors de l'analyse de l'expression des gènes d'intérêts dans des animaux vivants et elles permettront de mieux comprendre l'implication des gènes dans la mise en place de certains caractères morphologiques et comportementaux.



## Conclusions et perspectives

En conclusion, notre étude sur l'évolution du système nerveux et du comportement chez l'*Astyanax mexicanus* nous a permis de mieux comprendre les réseaux neuronaux et les régulations présents chez notre modèle. Une partie de ces connaissances pourra être probablement appliqué à l'ensemble des vertébrés.

D'un point de vue comportemental, cette étude a permis de décrire finement la perte de l'agressivité chez les CF. En réalité, « l'agressivité » des SF correspond principalement à la mise en place et au maintien de la hiérarchie alors que chez les CF les « vestiges de l'agressivité » correspondent à une recherche frénétique de nourriture. Après une période de jeûne, le nombre d'attaque des CF augmente car la recherche de nourriture est d'autant plus frénétique dans ces conditions. La fréquence des attaques diminue au cours du temps, le pattern décroissant étant le profil type de la recherche de nourriture. En revanche, chez les SF, une période de jeûne inhibe le comportement alimentaire. Nous supposons que le comportement hiérarchique est atténué lorsque les poissons ont un hypométabolisme.

Un lien fort entre l'agressivité et la sérotonine est connu chez les vertébrés. Globalement, il existe une corrélation inverse entre l'agressivité et le taux de sérotonine chez les vertébrés (Bortolato et al.; Dennis et al., 2008; Heiming et al., 2013; Larson and Summers, 2001; Lucki, 1998; Lynn et al., 2007; Winberg et al., 2001). C'est également le cas chez l'*Astyanax*. De fait, les SF « agresseurs » sont les poissons dominants et les dosages HPLC ont montré qu'ils régulent le taux de 5HT du raphé à la baisse. En augmentant pharmacologiquement ce taux via la fluoxétine ou le déprenyl, les poissons avaient une concentration plus élevée de 5HT dans l'ensemble du cerveau, y compris dans le raphé, et l'agressivité était abolie (plus de pattern typique et diminution drastique du nombre d'attaques).



Cependant, ces traitements n'avaient pas les mêmes effets sur les CF. En réalité, « l'agressivité » des CF est légèrement augmentée par ces traitements. Cela peut être expliqué par la recherche frénétique de nourriture. On sait que l'hypothalamus est un centre de contrôle important pour le comportement alimentaire. Or, l'extension du territoire d'expression de *Shh* provoque une augmentation de la taille de l'hypothalamus avec, entre autres, une amplification de la taille du noyau sérotoninergique paraventriculaire. Ces neurones sont voisins de neurones synthétisant des neuropeptides impliqués dans la prise alimentaire (comme le neuropeptide NPY). Il est probable que le système sérotoninergique stimule la recherche de nourriture. Par conséquent, les traitements pharmacologiques, en augmentant la concentration de sérotonine dans l'ensemble du cerveau (y compris dans l'hypothalamus), ont donc amplifié la recherche de nourriture. On observe alors une augmentation du nombre d'attaques. Le pattern d'agressivité est cependant resté décroissant, profil typique de la recherche de nourriture.

Notre étude a montré que l'amplification du système sérotoninergique avait une origine à la fois morphologique et biochimique. En effet, l'activité de la MAO est fortement réduite chez les CF. Le séquençage de l'ADNc de la MAO montre plusieurs mutations fixées chez les CF. En particulier, une mutation proche d'un site de liaison provoque le changement d'une proline en leucine. La structure moléculaire de la proline provoque la formation d'un angle dans la protéine. Cette mutation est probablement à l'origine de la perte de l'activité de cette enzyme. Cette variation d'activité a pour conséquence une diminution de la dégradation de la sérotonine. Cependant, les dosages HPLC montrent que les concentrations des autres neurotransmetteurs aminergiques ne sont pas soumises à l'activité de la monoamine oxydase. En effet, après un traitement au déprényl, les concentrations des catécholamines ne varient pas, suggérant que leur dégradation n'est pas sous l'influence de la MAO.

Notre hypothèse est que, contrairement aux mammifères, les neurotransmetteurs catécholaminergiques ne sont pas dégradés par le couple d'enzyme MAO/COMT. Nous proposons que leurs dégradations se fassent via les enzymes DBH et PNMT, c'est-à-dire en synthétisant à partir de la dopamine de la noradrénaline puis de l'adrénaline. Cela suggère que l'adrénaline serait un métabolite et n'aurait pas d'action de neurotransmission dans le cerveau



des *Astyanax*. Cela permettrait d'expliquer que la concentration d'adrénaline soit forte chez l'*Astyanax* (alors qu'elle n'est pas détectable chez les mammifères) et que la concentration de VMA n'est pas détectable.

La comparaison des concentrations des catécholamines entre les SF et les CF montre que les neurotransmetteurs aminergiques ont de plus fortes concentrations et sont plus actifs (ratios métabolite/neurotransmetteur plus faibles) chez les CF. Ce résultat ainsi que la comparaison du système sérotoninergique suggèrent qu'un phénotype « hyper-aminergique » existe chez les CF. Ce phénotype doit avoir de nombreuses conséquences physiologiques et comportementales et doit probablement être à l'origine de nombreuses adaptations nécessaires à la vie cavernicole.

L'ensemble de cette étude a été réalisée chez la population cavernicole issue de la grotte Pachón. L'étude d'autres populations cavernicoles est nécessaire pour compléter notre compréhension de l'adaptation à la vie cavernicole. Par exemple, les résultats préliminaires obtenus sur les CF issus de la caverne Molino montrent qu'ils ont perdu leur « agressivité » et présentent une fréquence d'attaque constante au cours du temps. Ce résultat suggère que cette population, comme les Pachón, a perdu le comportement hiérarchique et probablement la capacité de down-réguler la sérotonine au niveau du raphé mais, contrairement aux Pachón, ne recherche pas frénétiquement de la nourriture. En combinant ces études à l'analyse du système sérotoninergique et à l'étude de l'apport de nourriture dans les différentes cavernes, nous pourrions comprendre l'implication de l'adaptation de ces systèmes dans l'adaptation de ces poissons à leur habitat naturel.

De même, les variations environnementales qui existent entre les différentes grottes doivent être prises en compte pour comprendre l'implication et l'adaptation des comportements. Par exemple, comme le propose Yoshizawa, le VAB peut permettre d'augmenter les chances de trouver de la nourriture (Yoshizawa and Jeffery, 2011). Sachant que toutes les populations cavernicoles ne présentent pas ce comportement avec la même amplitude (Yoshizawa, communication personnelle), on peut supposer que l'apparition de ce comportement dépend des ressources de nourriture ainsi que de la présence ou non de prédation dans l'environnement naturel.





Par ailleurs, des études permettant de comprendre les conséquences physiologiques et comportementales du phénotype « hyper-aminergique » sont nécessaires. Entre autres, l'origine indépendante de certaines populations cavernicoles est un avantage de notre modèle qui n'a pas été utilisé pendant ce projet. En comparant à la fois les modifications des systèmes aminergiques et du comportement qui peuvent se retrouver spécifiquement dans certaines populations, les études futures pourront probablement disséquer précisément les modifications des systèmes aminergiques et ainsi faire le lien avec leurs conséquences comportementales.

Avec le développement de nouveaux outils, les études ultérieures bénéficieront de ressources aujourd'hui indisponibles. L'absence de génome séquencé chez l'*Astyanax* est l'une de nos limitations. Par exemple, il est connu que la modification de certains récepteurs à la sérotonine perturbe le comportement agressif des mammifères (Naumenko et al., 2013; Ramboz et al., 1996; Saudou et al., 1994). A l'heure actuelle, au vu de la complexité et de la similitude génétique des récepteurs sérotoninergiques, la comparaison de la localisation et de la séquence des différents récepteurs est impossible chez l'*Astyanax*. En revanche, lorsque le génome sera séquencé, ce genre d'analyse couplé aux outils pharmacologiques permettra probablement de mieux comprendre l'implication des différents récepteurs dans la mise en place de ce comportement. Par ailleurs, le génome pourra permettre d'obtenir, entre autres, des séquences régulatrices de noyaux spécifiques comme le noyau sérotoninergique hypothalamique paraventriculaire. La mise en place de lignées transgéniques utilisant les techniques d'optogénétique ou de « killer-red » pourront permettre d'analyser *in vivo* les conséquences de l'activation ou de la destruction de ces neurones spécifiquement sur les comportements alimentaire et agressif.



# Bibliographie

## A

Aarestrup, K., Økland, F., Hansen, M.M., Righton, D., Gargan, P., Castonguay, M., Bernatchez, L., Howey, P., Sparholt, H., Pedersen, M.I., et al. (2009). Oceanic Spawning Migration of the European Eel (*Anguilla anguilla*). *Science* 325, 1660–1660.

Alanärä, A. (1992). Demand feeding as a self-regulating feeding system for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in net-pens. *Aquaculture* 108, 347–356.

Alanärä, A., Winberg, S., Brännäs, E., Kiessling, A., Höglund, E., and Elofsson, U. (1998). Feeding behaviour, brain serotonergic activity levels, and energy reserves of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) within a dominance hierarchy. *Canadian Journal of Zoology* 76, 212–220.

Alenina, N., Bashammakh, S., and Bader, M. (2006). Specification and differentiation of serotonergic neurons. *Stem Cell Rev* 2, 5–10.

Alifragis, P., Liapi, A., and Parnavelas, J.G. (2004). Lhx6 Regulates the Migration of Cortical Interneurons from the Ventral Telencephalon But Does Not Specify their GABA Phenotype. *J. Neurosci.* 24, 5643–5648.

Alunni, A., Menuet, A., Candal, E., Pénigault, J.-B., Jeffery, W.R., and Rétaux, S. (2007). Developmental mechanisms for retinal degeneration in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *J. Comp. Neurol.* 505, 221–233.

Anichtchik, O., Sallinen, V., Peitsaro, N., and Panula, P. (2006). Distinct structure and activity of monoamine oxidase in the brain of zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol.* 498, 593–610.

## B

Barreiros, J.P., Santos, R.S., and De Borba, Alfredo Emilio (2002). Food habits, schooling and predatory behaviour of the yellowmouth barracuda, *Sphyrna viridensis* (perciformes: sphyrnaeidae) in the azores. *Cybiurn* 26, 83–88.

Bellipanni, G., Rink, E., and Bally-Cuif, L. (2002). Cloning of two tryptophan hydroxylase genes expressed in the diencephalon of the developing zebrafish brain. *Mechanisms of Development* 119, Supplement, S215–S220.



- Benhaïm, D., Péan, S., Brisset, B., Leguay, D., Bégout, M.-L., and Chatain, B. (2011). Effect of size grading on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile self-feeding behaviour, social structure and culture performance. *Aquatic Living Resources* 24, 391–402.
- Bierbach, D., Jung, C.T., Hornung, S., Streit, B., and Plath, M. (2013). Homosexual behaviour increases male attractiveness to females. *Biol. Lett.* 9.
- Borowsky, R. (2008a). Restoring sight in blind cavefish. *Current Biology* 18, R23–R24.
- Borowsky, R. (2008b). In Vitro Fertilization of *Astyanax mexicanus*. *Cold Spring Harb Protoc* 2008, pdb.prot5092.
- Borowsky R. (2008c). Emerging Model Organisms.
- Bortolato, M., Pivac, N., Seler, D.M., Perkovic, M.N., Pessia, M., and Di Giovanni, G. The role of the serotonergic system at the interface of aggression and suicide. *Neuroscience*.
- Bradic, M., Beerli, P., García-de León, F.J., Esquivel-Bobadilla, S., and Borowsky, R.L. (2012). Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex (*Astyanax mexicanus*). *BMC Evol. Biol.* 12, 9.
- Breder, C.M.J., and Rasquin, P. (1943). Chemical sensory reactions in the Mexican blind characin. *Zoologica* 28, 169–200.
- Briggs, J.C. (2005). The biogeography of otophysan fishes (Ostariophysi: Otophysi): a new appraisal. *Journal of Biogeography* 32, 287–294.
- Burchards, H., Dölle, A., and Parzefall, J. (1985). Aggressive behaviour of an epigeal population of *Astyanax mexicanus* (Characidae, Pisces) and some observations of three subterranean populations. *Behavioural Processes* 11, 225–235.
- Büttiker, P.B., and Matthey, G. (1986). Migration de la truite lacustre (*Salmo trutta lacustris* L.) dans le Léman et ses affluents. *Schweiz. Z. Hydrol* 48, 153–160.

## C

- Campan, R., and Scapini, F. (2002). *Éthologie: Approche systémique du comportement* (De Boeck Supérieur).
- Campbell, N.A., and Reece, J.B. (2004). *Biologie* (Bruxelles [Paris]: De Boeck).
- Candy, J., and Collet, C. (2005). Two tyrosine hydroxylase genes in teleosts. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1727, 35–44.
- Castillo Cajas, R.F., Selz, O.M., Ripmeester, E.A.P., Seehausen, O., and Maan, M.E. (2012). Species-Specific Relationships between Water Transparency and Male Coloration within and between Two Closely Related Lake Victoria Cichlid Species. *Int J Evol Biol* 2012, 161306.



Chang, C., Li, C.-Y., Earley, R.L., and Hsu, Y. (2012). Aggression and related behavioral traits: the impact of winning and losing and the role of hormones. *Integr. Comp. Biol.* 52, 801–813.

Chen, J.K. (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes & Development* 16, 2743–2748.

Chen, K., Wu, H.F., Grimsby, J., and Shih, J.C. (1994). Cloning of a novel monoamine oxidase cDNA from trout liver. *Mol Pharmacol* 46, 1226–1233.

Clarke, J. (2009). Role of polarized cell divisions in zebrafish neural tube formation. *Current Opinion in Neurobiology* 19, 134–138.

Clarke, C.A., and Sheppard, P.M. (1964). Genetic Control of the Melanic Form insularia of the Moth *Biston betularia* (L.). *Nature* 202, 215–216.

Clotfelter, E.D., and Kuperberg, E.S. (2007). Cerebral lateralization and its relationship to phylogeny and aggression in anabantoid fishes. *Brain Behav. Evol.* 69, 169–175.

Cook, L.M., Mani, G.S., and Varley, M.E. (1986). Postindustrial melanism in the peppered moth. *Science* 231, 611–613.

Covès, D., Beauchaud, M., Attia, J., Dutto, G., Bouchut, C., and Bégout, M.L. (2006). Long-term monitoring of individual fish triggering activity on a self-feeding system: An example using European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 253, 385–392.

## D

Danchin E., Giraldeau, L.A., Cézilly F. (2005). *Écologie comportementale: cours et questions de réflexion* (Paris: Dunod).

Daouk, T., Larcher, T., Roupsard, F., Lyphout, L., Rigaud, C., Ledevin, M., Loizeau, V., and Cousin, X. (2011). Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situations induces ovary pathology and impairs reproduction ability. *Aquatic Toxicology* 105, 270–278.

Darwin, C. (1859). *On the Origin of the Species by Means of Natural Selection: Or, The Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life* (John Murray).

Dekens, M.P., and Whitmore, D. (2008). Autonomous onset of the circadian clock in the zebrafish embryo. *EMBO J* 27, 2757–2765.

Deneris, E.S. (2011). Molecular genetics of mouse serotonin neurons across the lifespan. *Neuroscience* 197, 17–27.

Dennis, R.L., Chen, Z.Q., and Cheng, H.W. (2008). Serotonergic mediation of aggression in high and low aggressive chicken strains. *Poult. Sci.* 87, 612–620.





Dennis, R.L., Fahey, A.G., and Cheng, H.W. (2013). Alterations to Embryonic Serotonin Change Aggression and Fearfulness. *Aggress Behav.*

Descartes, R. (1664). *Traité de l'Homme*.

Di-Poi, C., Beauchaud, M., Bouchut, C., Dutto, G., Covès, D., and Attia, J. (2008). Effects of high food-demand fish removal in groups of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Canadian Journal of Zoology* 86, 1015–1023.

Di-Poi, C., Attia, J., Bouchut, C., Dutto, G., Covès, D., and Beauchaud, M. (2007). Behavioral and neurophysiological responses of European sea bass groups reared under food constraint. *Physiology & Behavior* 90, 559–566.

Dittman, A., and Quinn, T. (1996). Homing in Pacific salmon: mechanisms and ecological basis. *J Exp Biol* 199, 83–91.

Duboué, E.R., Keene, A.C., and Borowsky, R.L. (2011). Evolutionary Convergence on Sleep Loss in Cavefish Populations. *Current Biology* 21, 671–676.

Dufton, M., Hall, B.K., and Franz-Odenaal, T.A. (2012). Early Lens Ablation Causes Dramatic Long-Term Effects on the Shape of Bones in the Craniofacial Skeleton of *Astyanax mexicanus*. *PLoS ONE* 7, e50308.

## E

Echevarría, D., Vieira, C., Gimeno, L., and Martínez, S. (2003). Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain Research Reviews* 43, 179–191.

Ekström, P., and Van Veen, T. (1984). Distribution of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in the brain of the teleost *Gasterosteus aculeatus* L. *J. Comp. Neurol.* 226, 307–320.

Ekström, P., Nyberg, L., and Van Veen, T. (1985). Ontogenetic development of serotonergic neurons in the brain of a teleost, the three-spined stickleback. An immunohistochemical analysis. *Brain Res.* 349, 209–224.

Elbaz, I., Gothilf, Y., and Appelbaum, L. (2013). Circadian clocks, rhythmic synaptic plasticity and the sleep-wake cycle in zebrafish. *Front. Neural Circuits* 7, 9.

Elipot, Y., Hinaux, H., Callebert, J., and Rétaux, S. (2013). Evolutionary Shift from Fighting to Foraging in Blind Cavefish through Changes in the Serotonin Network. *Current Biology* 23, 1–10.

Espinas, A.V. (1878). *Des sociétés animales* (G. Bailliére et cie).



Espinasa, L., Yamamoto, Y., and Jeffery, W.R. (2005). Non-optical releasers for aggressive behavior in blind and blinded *Astyanax* (Teleostei, Characidae). *Behavioural Processes* 70, 144–148.

## F

Fernald, R.D. (2003). How does Behavior Change the Brain? Multiple Methods to Answer Old Questions. *Integr. Comp. Biol.* 43, 771–779.

Flinn, L., Bretaud, S., Lo, C., Ingham, P.W., and Bandmann, O. (2008). Zebrafish as a new animal model for movement disorders. *Journal of Neurochemistry* 106, 1991–1997.

Franz-Odenaal, T.A., and Hall, B.K. (2006). Modularity and sense organs in the blind cavefish, *Astyanax mexicanus*. *Evolution & Development* 8, 94–100.

## G

Garland, T., and Kelly, S.A. (2006). Phenotypic plasticity and experimental evolution. *J Exp Biol* 209, 2344–2361.

Gaspar, P., and Lillesaar, C. (2012). Probing the diversity of serotonin neurons. *Phil. Trans. R. Soc. B* 367, 2382–2394.

Gasparini, C., Serena, G., and Pilastro, A. (2013). Do unattractive friends make you look better? Context-dependent male mating preferences in the guppy. *Proc. Biol. Sci.* 280, 20123072.

Gautrais, J., Ginelli, F., Fournier, R., Blanco, S., Soria, M., Chaté, H., and Theraulaz, G. (2012). Deciphering interactions in moving animal groups. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002678.

Ghysen, A., and Dambly-Chaudière, C. (2003). Le développement du système nerveux□: de la mouche au poisson, du poisson à l'homme.... *Médecine/sciences* 19, 575–581.

Ghysen, A., and Dambly-Chaudière, C. (2005). The three-sided romance of the lateral line: Glia love axons love precursors love glia. *BioEssays* 27, 488–494.

Grabher, C., and Wittbrodt, J. (2007). Meganuclease and transposon mediated transgenesis in medaka. *Genome Biology* 8, S10.

Grabher, C., Joly, J.-S., and Wittbrodt, J. (2004). Highly efficient zebrafish transgenesis mediated by the meganuclease I-SceI. *Methods Cell Biol.* 77, 381–401.



Griffiths, and Magurran (1998). Sex and schooling behaviour in the Trinidadian guppy. *Anim Behav* 56, 689–693.

Gross, J.B., Borowsky, R., and Tabin, C.J. (2009). A Novel Role for Mc1r in the Parallel Evolution of Depigmentation in Independent Populations of the Cavefish *Astyanax mexicanus*. *PLoS Genet* 5, e1000326.

## H

Hagemann, A.I.H., and Scholpp, S. (2012). The Tale of the Three Brothers - Shh, Wnt, and Fgf during Development of the Thalamus. *Front Neurosci* 6, 76.

Hawkins T.H. (1950). Opening of Milk Bottles By Birds. *Nature* 165, 435–436.

Heiming, R.S., Mönning, A., Jansen, F., Kloke, V., Lesch, K.-P., and Sachser, N. (2013). To attack, or not to attack? The role of serotonin transporter genotype in the display of maternal aggression. *Behavioural Brain Research* 242, 135–141.

Hinaux, H., Pottin, K., Chalhoub, H., Père, S., Elipot, Y., Legendre, L., and Rétaux, S. (2011). A developmental staging table for *Astyanax mexicanus* surface fish and Pachón cavefish. *Zebrafish* 8, 155–165.

Hinaux, H., Poulain, J., Da Silva, C., Noiro, C., Jeffery, W.R., Casane, D., and Rétaux, S. (2013). De Novo Sequencing of *Astyanax mexicanus* Surface Fish and Pachón Cavefish Transcriptomes Reveals Enrichment of Mutations in Cavefish Putative Eye Genes. *PLoS ONE* 8, e53553.

Hirschenhauser, K., Wittek, M., Johnston, P., and Möstl, E. (2008). Social context rather than behavioral output or winning modulates post-conflict testosterone responses in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Physiology & Behavior* 95, 457–463.

Hoare, D.J., and Krause, J. (2003). Social organisation, shoal structure and information transfer. *Fish and Fisheries* 4, 269–279.

Höglund, E., Kolm, N., and Winberg, S. (2001). Stress-induced changes in brain serotonergic activity, plasma cortisol and aggressive behavior in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) is counteracted by l-DOPA. *Physiology & Behavior* 74, 381–389.

Hynes, M., Porter, J.A., Chiang, C., Chang, D., Tessier-Lavigne, M., Beachy, P.A., and Rosenthal, A. (1995). Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron* 15, 35–44.



## I

Inoue, J.G., Miya, M., Miller, M.J., Sado, T., Hanel, R., Hatooka, K., Aoyama, J., Minegishi, Y., Nishida, M., and Tsukamoto, K. (2010). Deep-ocean origin of the freshwater eels. *Biology Letters* 6, 363–366.

Iwamatsu, T. (2004). Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mechanisms of Development* 121, 605–618.

## J

Jansen, F., Heiming, R.S., Kloke, V., Kaiser, S., Palme, R., Lesch, K.-P., and Sachser, N. (2011). Away game or home match: The influence of venue and serotonin transporter genotype on the display of offensive aggression. *Behavioural Brain Research* 219, 291–301.

Jaroensutasinee, M., and Jaroensutansinee, K. (2001). Bubble nest habitat characteristics of wild Siamese fighting fish. *Journal of Fish Biology* 58, 1311–1319.

Jaroensutasinee, M., and Jaroensutasinee, K. (2003). Type of intruder and reproductive phase influence male territorial defence in wild-caught Siamese fighting fish. *Behavioural Processes* 64, 23–29.

Jeffery, W.R. (2001). Cavefish as a Model System in Evolutionary Developmental Biology. *Developmental Biology* 231, 1–12.

Jeffery, W.R. (2008). Emerging model systems in evo-devo: cavefish and microevolution of development. *Evolution & Development* 10, 265–272.

Jeffery, W.R. (2009). Regressive Evolution in *Astyanax* Cavefish. *Annual Review of Genetics* 43, 25–47.

Jeffery, W.R., Strickler, A.G., Guiney, S., Heyser, D.G., and Tomarev, S.I. (2000). Prox 1 in eye degeneration and sensory organ compensation during development and evolution of the cavefish *Astyanax*. *Dev Gene Evol* 210, 223–230.





## K

- Kawakami, K. (2005). Transposon tools and methods in zebrafish. *Developmental Dynamics* 234, 244–254.
- Kawakami, K. (2007). Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol.* 8 *Suppl 1*, S7.
- Kettlewell (1955). Selection experiments on industrial melanism in the Lepidoptera. *Heredity* 9, 323–342.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., and Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203, 253–310.
- Kiyasova, V., and Gaspar, P. (2011). Development of raphe serotonin neurons from specification to guidance. *European Journal of Neuroscience* 34, 1553–1562.
- Koga, A. (2004). Transposition mechanisms and biotechnology applications of the medaka fish Tol2 transposable element. *Adv. Biophys.* 38, 161–180.
- Kolb, B., and Wishaw, I.Q. (2002). *Cerveau et comportement (De Boeck Supérieur)*.
- Kolm, N., Amcoff, M., Mann, R.P., and Arnqvist, G. (2012). Diversification of a Food-Mimicking Male Ornament via Sensory Drive. *Current Biology* 22, 1440–1443.
- Kumazawa, T., Seno, H., Ishii, A., Suzuki, O., and Sato, K. (1998). Monoamine oxidase activities in catfish (*Parasilurus asotus*) tissues. *J. Enzym. Inhib.* 13, 377–384.

## L

- Langecker, T.G., Neumann, B., Hausberg, C., and Parzefall, J. (1995). Evolution of the optical releasers for aggressive behavior in cave-dwelling *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). *Behavioural Processes* 34, 161–167.
- Larson, E.T., and Summers, C.H. (2001). Serotonin reverses dominant social status. *Behavioural Brain Research* 121, 95–102.
- Lillesaar, C. (2011). The serotonergic system in fish. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 41, 294–308.
- Lillesaar, C., Stigloher, C., Tannhäuser, B., Wullmann, M.F., and Bally-Cuif, L. (2009). Axonal projections originating from raphe serotonergic neurons in the developing and adult zebrafish, *Danio rerio*, using transgenics to visualize raphe-specific *pet1* expression. *J. Comp. Neurol.* 512, 158–182.



Lohmann, K.J., Putman, N.F., and Lohmann, C.M.F. (2008). Geomagnetic imprinting: A unifying hypothesis of long-distance natal homing in salmon and sea turtles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 19096–19101.

Lucki, I. (1998). The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biological Psychiatry* *44*, 151–162.

Lynn, S.E., Egar, J.M., Walker, B.G., Sperry, T.S., and Ramenofsky, M. (2007). Fish on Prozac: a simple, noninvasive physiology laboratory investigating the mechanisms of aggressive behavior in *Betta splendens*. *Advan in Physiol Edu* *31*, 358–363.

## M

Maan, M.E., and Seehausen, O. (2011). Ecology, sexual selection and speciation. *Ecology Letters* *14*, 591–602.

Maan, M.E., Seehausen, O., Söderberg, L., Johnson, L., Ripmeester, E.A.P., Mrosso, H.D.J., Taylor, M.I., Van Dooren, T.J.M., and Van Alphen, J.J.M. (2004). Intraspecific sexual selection on a speciation trait, male coloration, in the Lake Victoria cichlid *Pundamilia nyererei*. *Proc. Biol. Sci.* *271*, 2445–2452.

Mathieu, J., Barth, A., Rosa, F.M., Wilson, S.W., and Peyriéras, N. (2002). Distinct and cooperative roles for Nodal and Hedgehog signals during hypothalamic development. *Development* *129*, 3055–3065.

Maximino, C., and Herculano, A.M. (2010). A Review of Monoaminergic Neuropsychopharmacology in Zebrafish. *Zebrafish* *7*, 359–378.

McCauley, D.W., Hixon, E., and Jeffery, W.R. (2004). Evolution of pigment cell regression in the cavefish *Astyanax*: a late step in melanogenesis. *Evolution & Development* *6*, 209–218.

Menuet, A., Alunni, A., Joly, J.-S., Jeffery, W.R., and Rétaux, S. (2007). Expanded expression of Sonic Hedgehog in *Astyanax* cavefish: multiple consequences on forebrain development and evolution. *Development* *134*, 845–855.

Mohammadi, M., McMahon, G., Sun, L., Tang, C., Hirth, P., Yeh, B.K., Hubbard, S.R., and Schlessinger, J. (1997). Structures of the Tyrosine Kinase Domain of Fibroblast Growth Factor Receptor in Complex with Inhibitors. *Science* *276*, 955–960.

Mokeichev, A., Segev, R., and Ben-Shahar, O. (2010). Orientation saliency without visual cortex and target selection in archer fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 16726–16731.

Montgomery, J.C., Coombs, S., and Baker, C.F. (2001). The Mechanosensory Lateral Line System of the Hypogean form of *Astyanax Fasciatus*. *Environmental Biology of Fishes* *62*, 87–96.



Morris, R.G.M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation* 12, 239–260.

Mueller, T., and Wullimann, M.F. (2005). *Atlas Of Early Zebrafish Brain Development: A Tool For Molecular Neurogenetics* (Gulf Professional Publishing).

Mueller, T., Dong, Z., Berberoglu, M.A., and Guo, S. (2011). The dorsal pallium in zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Teleostei). *Brain Research* 1381, 95–105.

## N

Naoi, M., Maruyama, W., and Inaba-Hasegawa, K. (2012). Type A and B monoamine oxidase in age-related neurodegenerative disorders: Their distinct roles in neuronal death and survival. *Curr Top Med Chem*.

Nat, R., Salti, A., Suci, L., Ström, S., and Dechant, G. (2012). Pharmacological Modulation of the Hedgehog Pathway Differentially Affects Dorsal/Ventral Patterning in Mouse and Human Embryonic Stem Cell Models of Telencephalic Development. *Stem Cells and Development* 21, 1016–1046.

Naumenko, V.S., Kozhemyakina, R.V., Plyusnina, I.F., Kulikov, A.V., and Popova, N.K. (2013). Serotonin 5-HT1A receptor in infancy-onset aggression: Comparison with genetically defined aggression in adult rats. *Behavioural Brain Research* 243, 97–101.

Near, T.J., Eytan, R.I., Dornburg, A., Kuhn, K.L., Moore, J.A., Davis, M.P., Wainwright, P.C., Friedman, M., and Smith, W.L. (2012). Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. *PNAS* 109, 13698–13703.

Neves, G., Shah, M.M., Liodis, P., Achimastou, A., Denaxa, M., Roalfe, G., Sesay, A., Walker, M.C., and Pachnis, V. (2012). The LIM Homeodomain Protein Lhx6 Regulates Maturation of Interneurons and Network Excitability in the Mammalian Cortex. *Cereb. Cortex*.

Nicotra, A., and Senatori, O. (1989). Some characteristics of mitochondrial monoamine oxidase activity in eggs of carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol. Toxicol.* 92, 401–404.

Nicotra, A., Pierucci, F., Parvez, H., and Senatori, O. (2004). Monoamine Oxidase Expression During Development and Aging. *NeuroToxicology* 25, 155–165.

Niven, J.E. (2008). Evolution: Convergent Eye Losses in Fishy Circumstances. *Current Biology* 18, R27–R29.

Norton, W., and Bally-Cuif, L. (2010). Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC Neuroscience* 11, 90.



## O

Ohkubo, Y., Chiang, C., and Rubenstein, J.L. (2002). Coordinate regulation and synergistic actions of BMP4, SHH and FGF8 in the rostral prosencephalon regulate morphogenesis of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* *111*, 1–17.

Olton, D.S., and Samuelson, R.J. (1976). Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* *2*, 97–116.

## P

Panula, P., Sallinen, V., Sundvik, M., Kolehmainen, J., Torkko, V., Tiittula, A., Moshnyakov, M., and Podlasz, P. (2006). Modulatory Neurotransmitter Systems and Behavior: Towards Zebrafish Models of Neurodegenerative Diseases. *Zebrafish* *3*, 235–247.

Panula, P., Chen, Y.-C., Priyadarshini, M., Kudo, H., Semenova, S., Sundvik, M., and Sallinen, V. (2010). The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiology of Disease* *40*, 46–57.

Parichy, D.M. (2006). Evolution of danio pigment pattern development. *Heredity* *97*, 200–210.

Patton, P., Windsor, S., and Coombs, S. (2010). Active wall following by Mexican blind cavefish (*Astyanax mexicanus*). *J Comp Physiol A* *196*, 853–867.

Peichel, C.L. (2004). Social Behavior: How Do Fish Find Their Shoal Mate? *Current Biology* *14*, R503–R504.

Peng, Z., He, S., Wang, J., Wang, W., and Diogo, R. (2006). Mitochondrial molecular clocks and the origin of the major Otocephalan clades (Pisces: Teleostei): A new insight. *Gene* *370*, 113–124.

Pitcher, T.J., Partridge, B.L., and Wardle, C.S. (1976). A blind fish can school. *Science* *194*, 963–965.

Popek, W., Luszczek-Trojnar, E., Grag-Kozak, E., Fortuna-Wronska, D., and Epler, P. (2005). Effect of the pineal gland and melatonin on dopamine release from perfused hypothalamus of mature female carp during spawning and winter regression. *Acta Ichthyologica Et Piscatoria* *35*, 65–71.

Pottin, K., Hinaux, H., and Rétaux, S. (2011). Restoring eye size in *Astyanax mexicanus* blind cavefish embryos through modulation of the Shh and Fgf8 forebrain organising centres. *Development* *138*, 2467–2476.





Protas, M.E., and Patel, N.H. (2008). Evolution of Coloration Patterns. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 24, 425–446.

Protas, M.E., Hersey, C., Kochanek, D., Zhou, Y., Wilkens, H., Jeffery, W.R., Zon, L.I., Borowsky, R., and Tabin, C.J. (2006). Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. *Nature Genetics* 38, 107–111.

## R

Ramboz, S., Saudou, F., Amara, D.A., Belzung, C., Segu, L., Misslin, R., Buhot, M.C., and Hen, R. (1996). 5-HT1B receptor knock out--behavioral consequences. *Behav. Brain Res.* 73, 305–312.

Ramsay, R.R. (2012). Inhibitor design for monoamine oxidases. *Curr. Pharm. Des.*

Rees, J.L. (2003). Genetics of Hair and Skin Color. *Annual Review of Genetics* 37, 67–90.

Rembold, M., Lahiri, K., Foulkes, N.S., and Wittbrodt, J. (2006). Transgenesis in fish: efficient selection of transgenic fish by co-injection with a fluorescent reporter construct. *Nature Protocols* 1, 1133–1139.

Rétaux, S., and Elipot, Y. (2013). Feed or fight: A behavioral shift in blind cavefish. *Communicative & Integrative Biology* 6, e23166.

Rétaux, S., and Kano, S. (2010). Midline Signaling and Evolution of the Forebrain in Chordates: A Focus on the Lamprey Hedgehog Case. *Integr. Comp. Biol.* 50, 98–109.

Rétaux, S., Pottin, K., and Alunni, A. (2008). Shh and forebrain evolution in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *Biology of the Cell* 100, 139–147.

Reynolds, J.D., Goodwin, N.B., and Freckleton, R.P. (2002). Evolutionary transitions in parental care and live bearing in vertebrates. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 357, 269–281.

Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Seibt, K.J., Capiotti, K.M., Da Silva, R.S., and Bonan, C.D. (2011). Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicology and Teratology* 33, 608–617.

Righton, D., Aarestrup, K., Jellyman, D., Sébert, P., Van den Thillart, G., and Tsukamoto, K. (2012). The *Anguilla* spp. migration problem: 40 million years of evolution and two millennia of speculation. *J. Fish Biol.* 81, 365–386.

Romanes, G.J. (1888). *Animal intelligence* (D. Appleton).

Romero, A., Green, S.M., Romero, A., Lelonek, M.M., and Stropnický, K.C. (2003). One eye but no vision: cave fish with induced eyes do not respond to light. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 300, 72–79.



Ruhlé, C. (1990). Déclin et restauration de la population de truites lacustres (*Salmo trutta lacustris* L.) du lac de Constance. *Bulletin Français De La Pêche Et De La Pisciculture* 167–172.

## S

Sadoglu, P. (1956). A Preliminary Report on the Genetics of the Mexican Cave Characins. *Copeia* 2, 113–114.

Salin, K., Voituron, Y., Mourin, J., and Hervant, F. (2010a). Cave colonization without fasting capacities: An example with the fish *Astyanax fasciatus mexicanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 156, 451–457.

Sallinen, V., Sundvik, M., Reenilä, I., Peitsaro, N., Khrustalyov, D., Anichtchik, O., Toleikyte, G., Kaslin, J., and Panula, P. (2009). Hyperserotonergic phenotype after monoamine oxidase inhibition in larval zebrafish. *Journal of Neurochemistry* 109, 403–415.

Sanes, D.H., Reh, T.A., and Harris, W.A. (2006). *Development Of The Nervous System* (Academic Press).

Saudou, F., Amara, D.A., Dierich, A., LeMeur, M., Ramboz, S., Segu, L., Buhot, M.C., and Hen, R. (1994). Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor. *Science* 265, 1875–1878.

Schemmel, C. (1980). Studies on the genetics of feeding behaviour in the cave fish *Astyanax mexicanus* f. *anoptichthys*. An example of apparent monofactorial inheritance by polygenes. *Z Tierpsychol* 53, 9–22.

Schlegel, T., Schmid, C.J., and Schuster, S. (2006). Archerfish shots are evolutionarily matched to prey adhesion. *Current Biology* 16, R836–R837.

Scholpp, S., and Lumsden, A. (2010). Building a bridal chamber: development of the thalamus. *Trends in Neurosciences* 33, 373–380.

Schuster, S. (2007). Archerfish. *Current Biology* 17, R494–R495.

Senatori, O., Nicotra, A., and Scopelliti, R. (1990). Monoamine oxidase activity in embryos of pike (*Esox lucius*). *Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol. Toxicol.* 96, 87–90.

Senatori, O., Setini, A., Scirocco, A., and Nicotra, A. (2009). Effect of short-time exposures to nickel and lead on brain monoamine oxidase from *Danio rerio* and *Poecilia reticulata*. *Environ. Toxicol.* 24, 309–313.

Setini, A., Pierucci, F., Senatori, O., and Nicotra, A. (2005). Molecular characterization of monoamine oxidase in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 140, 153–161.



Sharma, S., Coombs, S., Patton, P., and Perera, T.B. de (2009). The function of wall-following behaviors in the Mexican blind cavefish and a sighted relative, the Mexican tetra (*Astyanax*). *J Comp Physiol A* 195, 225–240.

Shimogori, T., Banuchi, V., Ng, H.Y., Strauss, J.B., and Grove, E.A. (2004). Embryonic signaling centers expressing BMP, WNT and FGF proteins interact to pattern the cerebral cortex. *Development* 131, 5639–5647.

Soares, D., Yamamoto, Y., Strickler, A.G., and Jeffery, W.R. (2004). The Lens Has a Specific Influence on Optic Nerve and Tectum Development in the Blind Cavefish *Astyanax*. *Developmental Neuroscience* 26, 308–317.

Soroldoni, D., Hogan, B.M., and Oates, A.C. (2009). Simple and efficient transgenesis with meganuclease constructs in zebrafish. *Methods Mol. Biol.* 546, 117–130.

Sousa, V.H., and Fishell, G. (2010). Sonic hedgehog functions through dynamic changes in temporal competence in the developing forebrain. *Current Opinion in Genetics & Development* 20, 391–399.

Strecker, U., Faúndez, V.H., and Wilkens, H. (2004). Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33, 469–481.

Strickler, A.G., Famuditimi, K., and Jeffery, W.R. (2002). Retinal homeobox genes and the role of cell proliferation in cavefish eye degeneration. *Int. J. Dev. Biol.* 46, 285–294.

Striedter, G.F., and Northcutt, R.G. (2006). Head size constrains forebrain development and evolution in ray-finned fishes. *Evolution & Development* 8, 215–222.

Stuhlmiller, T.J., and García-Castro, M.I. (2012). Current perspectives of the signaling pathways directing neural crest induction. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69, 3715–3737.

## T

Thermes, V., Grabher, C., Ristoratore, F., Bourrat, F., Choulika, A., Wittbrodt, J., and Joly, J.-S. (2002). I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mechanisms of Development* 118, 91–98.

Timmermans, P.J., and Souren, P. (2004). Prey catching in archer fish: the role of posture and morphology in aiming behavior. *Physiology & Behavior* 81, 101–110.

Tole, S., Ragsdale, C.W., and Grove, E.A. (2000). Dorsoventral Patterning of the Telencephalon Is Disrupted in the Mouse Mutant extra-toesJ. *Developmental Biology* 217, 254–265.

Tolman, E.C. (1948). Cognitive maps in rats and men. *Psychol Rev* 55, 189–208.



## U

Ueda, H. (2011). Physiological mechanism of homing migration in Pacific salmon from behavioral to molecular biological approaches. *General and Comparative Endocrinology* 170, 222–232.

## V

Varatharasan, N., Croll, R.P., and Franz-Odenaal, T. (2009). Taste bud development and patterning in sighted and blind morphs of *Astyanax mexicanus*. *Developmental Dynamics* 238, 3056–3064.

Vieira, C., Pombero, A., Garcia-Lopez, R., Gimeno, L., Echevarria, D., and Martinez, S. (2010). Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *The International Journal of Developmental Biology* 54, 7–20.

Vitalis, T., Cases, O., Callebert, J., Launay, J.M., Price, D.J., Seif, I., and Gaspar, P. (1998). Effects of monoamine oxidase A inhibition on barrel formation in the mouse somatosensory cortex: determination of a sensitive developmental period. *J. Comp. Neurol.* 393, 169–184.

Vitalis, T., Fouquet, C., Alvarez, C., Seif, I., Price, D., Gaspar, P., and Cases, O. (2002). Developmental expression of monoamine oxidases A and B in the central and peripheral nervous systems of the mouse. *J. Comp. Neurol.* 442, 331–347.

Vitalis, T., Alvarez, C., Chen, K., Shih, J.C., Gaspar, P., and Cases, O. (2003). Developmental expression pattern of monoamine oxidases in sensory organs and neural crest derivatives. *J. Comp. Neurol.* 464, 392–403.

Volkoff, H., Xu, M., MacDonald, E., and Hoskins, L. (2009). Aspects of the hormonal regulation of appetite in fish with emphasis on goldfish, Atlantic cod and winter flounder: Notes on actions and responses to nutritional, environmental and reproductive changes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 153, 8–12.





## W

Walli, A., Teo, S.L.H., Boustany, A., Farwell, C.J., Williams, T., Dewar, H., Prince, E., and Block, B.A. (2009). Seasonal movements, aggregations and diving behavior of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) revealed with archival tags. *PLoS ONE* 4, e6151.

Wilkins, H. (1988). Evolution and genetics of epigean and cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces): support for the neutral mutation theory. *Evolutionary biology* 23, 271–367.

Wilson, E.O. (1975). *Sociobiology: the new synthesis* (Cambridge, Mass. London: Belknap press of Harvard university press).

Winberg, S., Øverli, Ø., and Lepage, O. (2001). Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary l-tryptophan. *J Exp Biol* 204, 3867–3876.

Windsor, S.P., Tan, D., and Montgomery, J.C. (2008). Swimming kinematics and hydrodynamic imaging in the blind Mexican cave fish (*Astyanax fasciatus*). *J Exp Biol* 211, 2950–2959.

Windsor, S.P., Norris, S.E., Cameron, S.M., Mallinson, G.D., and Montgomery, J.C. (2010). The flow fields involved in hydrodynamic imaging by blind Mexican cave fish (*Astyanax fasciatus*). Part II: gliding parallel to a wall. *J Exp Biol* 213, 3832–3842.

Wolpert, L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J. Theor. Biol.* 25, 1–47.

Wolpert, L. (1929-), Beddington, R., Brockes, J., and Jessell, T. (2004). *Biologie du développement*: les grands principes.

Wu, X., Walker, J., Zhang, J., Ding, S., and Schultz, P.G. (2004). Purmorphamine Induces Osteogenesis by Activation of the Hedgehog Signaling Pathway. *Chemistry & Biology* 11, 1229–1238.

## X

Xi, Y., Noble, S., and Ekker, M. (2011). Modeling Neurodegeneration in Zebrafish. *Curr Neurol Neurosci Rep* 11, 274–282.



## Y

- Yamamoto, Y. (2000). Central Role for the Lens in Cave Fish Eye Degeneration. *Science* 289, 631–633.
- Yamamoto, K., and Vernier, P. (2011). The evolution of dopamine systems in chordates. *Front. Neuroanat.* 5, 21.
- Yamamoto, Y., and Jeffery, W.R. (2002). Probing teleost eye development by lens transplantation. *Methods* 28, 420–426.
- Yamamoto, K., Ruuskanen, J.O., Wullimann, M.F., and Vernier, P. (2010). Two tyrosine hydroxylase genes in vertebrates: New dopaminergic territories revealed in the zebrafish brain. *Molecular and Cellular Neuroscience* 43, 394–402.
- Yamamoto, N., Ishikawa, Y., Yoshimoto, M., Xue, H.-G., Bahaxar, N., Sawai, N., Yang, C.-Y., Ozawa, H., and Ito, H. (2007). A new interpretation on the homology of the teleostean telencephalon based on hodology and a new eversion model. *Brain Behav. Evol.* 69, 96–104.
- Yamamoto, Y., Espinasa, L., Stock, D.W., and Jeffery, W.R. (2003). Development and evolution of craniofacial patterning is mediated by eye-dependent and -independent processes in the cavefish *Astyanax*. *Evolution & Development* 5, 435–446.
- Yamamoto, Y., Stock, D.W., and Jeffery, W.R. (2004). Hedgehog signalling controls eye degeneration in blind cavefish. *Nature* 431, 844–847.
- Yamamoto, Y., Byerly, M.S., Jackman, W.R., and Jeffery, W.R. (2009). Pleiotropic functions of embryonic sonic hedgehog expression link jaw and taste bud amplification with eye loss during cavefish evolution. *Developmental Biology* 330, 200–211.
- Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J.L., Hynes, M.A., and Rosenthal, A. (1998). FGF and Shh Signals Control Dopaminergic and Serotonergic Cell Fate in the Anterior Neural Plate. *Cell* 93, 755–766.
- Yoshizawa, M., and Jeffery, W.R. (2008). Shadow response in the blind cavefish *Astyanax* reveals conservation of a functional pineal eye. *J Exp Biol* 211, 292–299.
- Yoshizawa, M., and Jeffery, W.R. (2011). Evolutionary tuning of an adaptive behavior requires enhancement of the neuromast sensory system. *Commun Integr Biol* 4, 89–91.
- Yoshizawa, M., Gorički, Š., Soares, D., and Jeffery, W.R. (2010). Evolution of a Behavioral Shift Mediated by Superficial Neuromasts Helps Cavefish Find Food in Darkness. *Current Biology* 20, 1631–1636.
- Yoshizawa, M., Yamamoto, Y., O’Quin, K.E., and Jeffery, W.R. (2012). Evolution of an adaptive behavior and its sensory receptors promotes eye regression in blind cavefish. *BMC Biol.* 10, 108.



## Z

Zhdanova, I.V. (2011). Sleep and its regulation in zebrafish. *Rev Neurosci* 22, 27–36.

Zhu, X., Zhu, L., Lang, Y., and Chen, Y. (2008). Oxidative stress and growth inhibition in the freshwater fish *Carassius auratus* induced by chronic exposure to sublethal fullerene aggregates. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1979–1985.

Zugaro, M. (2001). Influences des signaux multisensoriels et moteurs dans l'élaboration des réponses des cellules de direction de la tête chez le rat.



# **Annexe**

## **A Developmental Staging Table for *Astyanax mexicanus* Surface Fish and Pachón Cavefish**

Publication publiée dans le journal

**Zebrafish**





## A Developmental Staging Table for *Astyanax mexicanus* Surface Fish and Pachón Cavefish

Hélène Hinaux,<sup>1</sup> Karen Pottin,<sup>1</sup> Houssein Chalhoub,<sup>1</sup> Stéphane Pèrè,<sup>1</sup> Yannick Elipot,<sup>1</sup>  
Laurent Legendre,<sup>2</sup> and Sylvie Rétaux<sup>1</sup>

### Abstract

Every model species requires its own developmental table. *Astyanax mexicanus*, a teleost fish comprising both sighted river and blind cave populations, is becoming more and more important in the field of developmental and evolutionary biology. As such, a developmental staging table is increasingly necessary, particularly since comparative analysis of early developmental events is widely employed by researchers. We collected freshly spawned embryos from surface fish and Pachón cavefish populations. Embryos were imaged every 10–12 min during the first day of development, and less frequently in the following days. The results provide an illustrated comparison of selected developmental stages from one cell to hatching of these two populations. The two morphs show an essentially synchronous development regarding major events such as epiboly, neurulation, somitogenesis, heart beating, or hatching. We also present data on particular morphological characters appearing during larval development, such as eye size, yolk regression, swim bladder, and fin development. Some details about the development of F1 Pachón cave × surface hybrids are also given. Comparisons are made with *Danio rerio* (zebrafish) development.

### Introduction

THE STUDY OF ANY MODEL ORGANISM is greatly enriched by the availability of a developmental staging table.<sup>1–3</sup> This is particularly true for developmental and evolutionary biology studies, as it allows an accurate comparison of different species or populations.

*Astyanax mexicanus*, also previously called *Astyanax fasciatus*, is a teleost fish, belonging to the Ostariophysi group, the same group as the zebrafish *Danio rerio*. However, *Astyanax* is a characiform while *Danio* is a cypriniform, these two lineages having diverged between 100 and 250 million years ago<sup>4,5</sup> (Fig. 1). First described by de Filippi,<sup>6</sup> *Astyanax mexicanus* is widely distributed and endemic to the rivers of Central and South America. Several populations of cave morphs have a very restricted distribution to 29 caves in the region of the Sierra de El Abra in Mexico.<sup>7</sup>

*Astyanax* is increasingly employed as an evo-devo model system.<sup>8,9</sup> Indeed, two types of populations, namely sighted and pigmented river-dwelling populations and blind and unpigmented cave populations, all deriving from surface fish ancestors, are powerful tools for evolutionary biology. The cave forms have diverged at least one million years ago from eyed ancestors, and have evolved specific morphological, neurological, and behavioral traits, allowing their adaptation

to the cave environment, characterized by permanent darkness and food scarcity.<sup>10</sup> Surface and cave forms are still inter-fertile and their cross produces a fertile progeny. A comparative study of the surface and cave forms reveals mechanisms of micro-evolution. Furthermore, at least three independent colonization events are at the origin of the 29 known cave populations,<sup>11,12</sup> permitting the study of parallel evolution.<sup>13</sup>

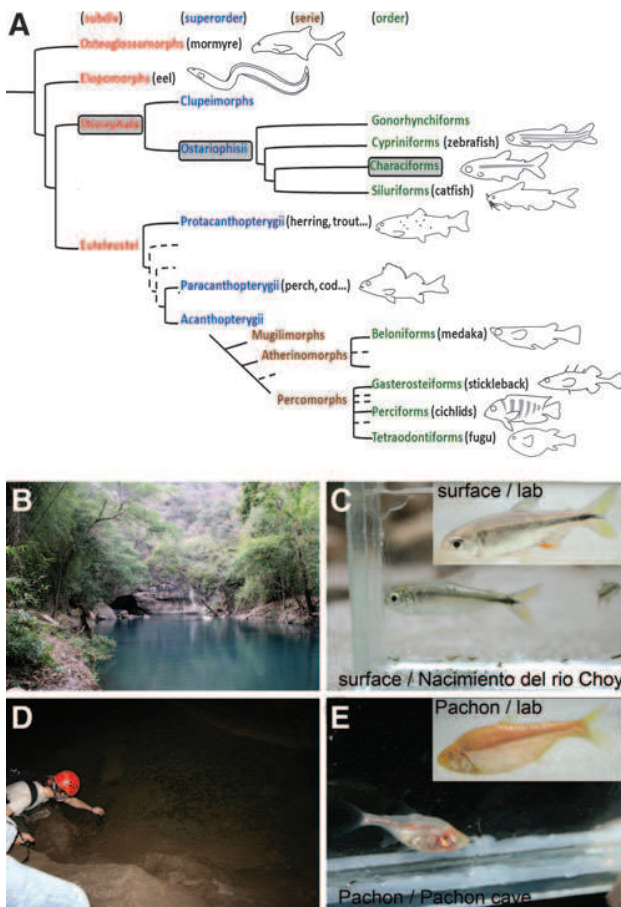
Pachón has been the most commonly used cave population, particularly in evo-devo studies. The transparency of *Astyanax mexicanus* embryos, as well as the fact that abundant spawning can be obtained regularly, facilitates these developmental studies. The synchronous development of Pachón and surface embryos has been hypothesized,<sup>14–20</sup> but never precisely assessed, and no developmental staging table exists for this species. The purpose of this study is to describe and analyze certain developmental details of surface and Pachón fish embryos from the one-cell stage to hatching, and to gain some insights into larval development in these two populations as well as in F1 hybrids.

### Materials and Methods

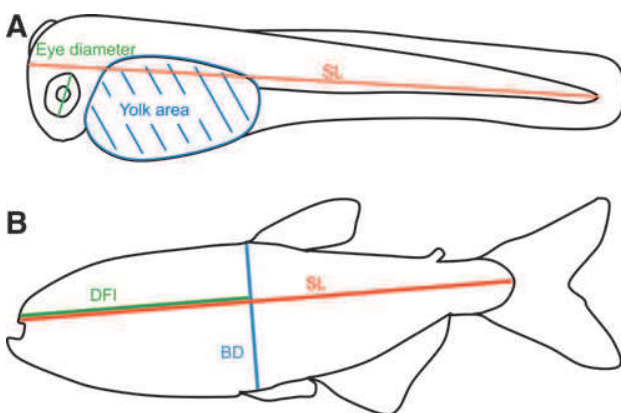
Laboratory stocks of *A. mexicanus* surface fish and Pachón cave fish were obtained in 2004 from the Jeffery laboratory at

<sup>1</sup>UPR 3294 N&D Laboratory, DECA Group, and <sup>2</sup>GIS AMAGEN CNRS INRA, Institut Alfred Fessard, Gif-sur-Yvette, France.

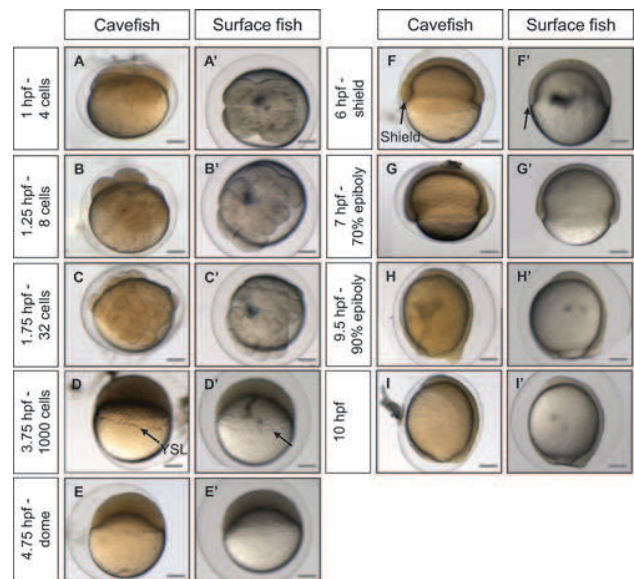




**FIG. 1.** Presentation of *Astyanax mexicanus* model fish. (A) Simplified phylogeny of the teleosts, showing *Astyanax mexicana* positioned among the Characiforms. (B) Example of the habitat of the surface form of *Astyanax mexicana*, in Nacimiento del Rio Choy. (C) *Astyanax mexicana* surface morphs, caught in the wild and a lab specimen (inset). (D) Pachón cave habitat. (E) *Astyanax mexicana* Pachón cave morphs, caught in Pachón cave and a lab specimen (inset).



**FIG. 2.** Methods for fish measurements. (A) Measurements performed on larvae. (B) Measurements performed on adults. BD, body depth; DFI, dorsal fin insertion; SL, standard length.



**FIG. 3.** Development of *Astyanax mexicanus* embryos from zero to 10 hpf. Pictures of cavefish (A–I) and surface fish (A'–I') embryos at stages indicated on the left, views are lateral, except for A–C' (views from the animal pole). Arrows indicate the yolk syncytial layer (YSL) in D–D' and the embryonic shield in F–F'. The scale bars represent 200  $\mu\text{m}$ .

the University of Maryland, College Park, MD. They had been both lab-raised for some generations, and surface fish had initially been collected in San Solomon Spring, Balmorhea State Park, Texas.

In our facility, they were maintained and bred at 23°C (Pachón) and 26°C (surface) on a 12:12 hours light/dark cycle in tap water (pH 8.1–8.2, conductivity 470–590  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). These conditions are not too different from the natural environment of these fish (water in Pachón cave: 23.3°C, pH 6.9; water in Nacimiento del Rio Choy: 26°C, pH 7, conductivity 1200  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; measurements done in March 2009 and March 2011). Surface  $\times$  Pachón F1 hybrids were obtained by cohabitation of a female Pachón fish and a male surface fish.

Fish are fed twice a day, once with live food (mosquito worms, artemias) and once with dry food. Surface fish receive TetraMin floating flakes (complete food for all ornamental fish, Tetra) as they feed at the water surface, and cave fish receive TetraPrima Discus sinking granules (complete food for Discus and big ornamental fish, Tetra) as they are bottom feeders. Spawning is induced by changing tank water and shifting temperature ( $-4^\circ\text{C}$  for surface fish,  $+4^\circ\text{C}$  for cavefish). It usually occurs in the middle of the night (between midnight and 2:00 AM). Embryos and larvae are maintained in a 23°C incubator in “blue water” (0.017 M NaCl,  $4.02 \cdot 10^{-4}$  M KCl,  $2.72 \cdot 10^{-4}$  M  $\text{CaCl}_2$ ,  $6.5 \cdot 10^{-4}$  M  $\text{MgSO}_4$ , methylene blue) for 3–4 weeks, and then transferred to “nurseries” in the main fish facility.

For the establishment of the developmental staging table, freshly spawned embryos were collected and imaged every 10–15 min using an Olympus SZX16 stereomicroscope in a room maintained at 23°C. To facilitate somite counts, the chorion of some embryos was removed. Newly hatched larvae were photographed once or twice a day. Pictures of some details of



the larvae were taken using an Apotome microscope (Zeiss). Adult fish were photographed using a Pentax X70 camera.

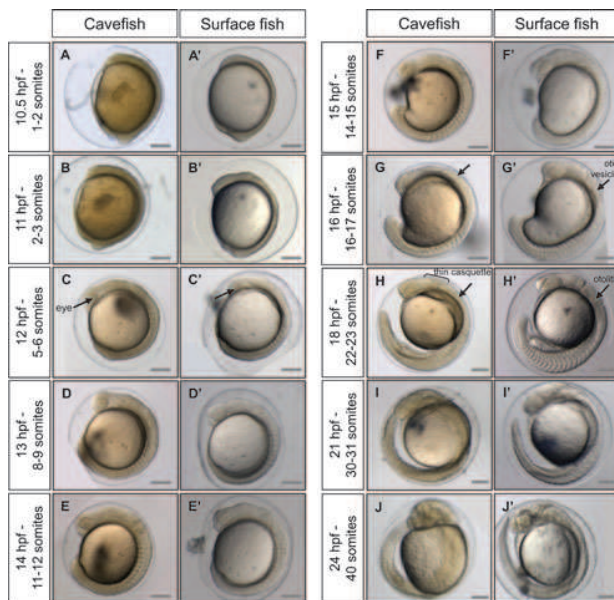
Standard length (length from snout to caudal fin peduncle), yolk size, eye size, and dorsal fin placement (projection of snout to dorsal fin-length divided by standard length) were measured using ImageJ software. Details of anatomical measurements performed on larvae and adults are depicted in Figure 2. Lengths of the embryos for yolk regression analysis were calculated by extrapolating embryos to a circle, calculating the circumference of this circle and subtracting the head-to-tail straight line length.

Paper chromatography was performed using Whatman paper as the stationary phase and a hexane:benzene 40:60 solution as the solvent. Fresh samples were squeezed against the paper. Spinach leaves were used as reference for pigment separation.

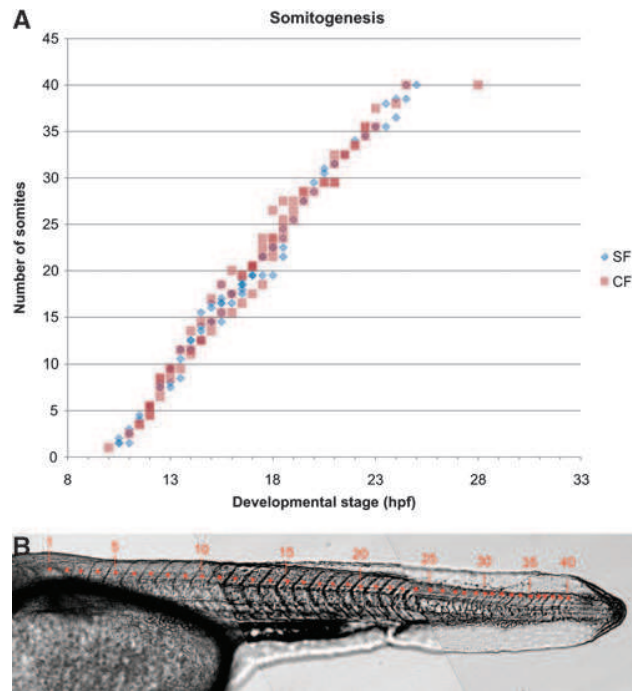
**Results and Discussion**

*Embryonic development*

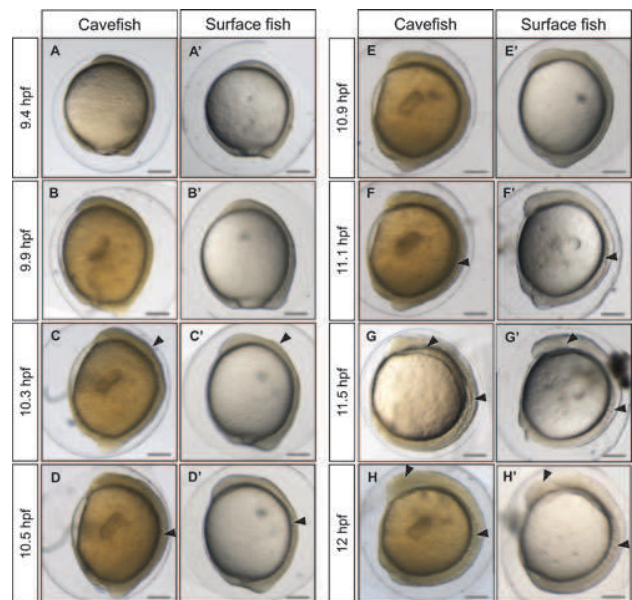
The development of surface and Pachón embryos was monitored every 10–15 min at 23°C. *Astyanax* embryos are surrounded by a soft chorion like that in *Danio*. However, the *Astyanax* chorion is sticky, leading to the formation of egg clusters, as in Medaka. Segmentation proceeds approximately at the same pace as in *Danio rerio*, with one division every 15 min from the 2-cell stage (Fig. 3). The 1000-cell stage, characterized by the appearance of the yolk syncytial layer (YSL), is reached at 3.75 hpf. Gastrulation proceeds through epiboly and the embryonic shield is visible at 6 hpf, which corresponds to 50% epiboly. Epiboly is completed around



**FIG. 4.** Development of *Astyanax mexicanus* embryos from 10 hpf to 24 hpf. Pictures of cavefish (A–J) and surface fish (A'–J') embryos in lateral views, at stages indicated on the left side. Arrows in C–C' indicate the eye, in G–G' the otic vesicle, in H–H' an otolith. The bracket in H indicates the forming casquette, an adhesive gland on the head of the larvae. The scale bars represent 200 μm.



**FIG. 5.** Somitogenesis. (A) Timing of somitogenesis in surface and cave embryos as a function of developmental stage. (B) Picture showing the definitive number of somites in a 30 hpf surface larva. Each red dot indicates one somite. SF means surface fish (blue), and CF means cave fish (red), as in all following figures.



**FIG. 6.** Morphogenetic events during neurulation. Pictures of cavefish (A–H) and surface fish (A'–H') embryos in lateral views, with exact stages indicated on the left. Arrowheads in C–C' and D–D' point to comparable shapes and curvatures of the anterior neural plate. Arrowheads in F–F' indicate the first appearing somites. In G–G' and H–H' arrowheads indicate the somites and the forming eye. The scale bars represent 200 μm.



TABLE 1. MAIN DEVELOPMENTAL LANDMARKS IN *ASTYANAX MEXICANUS* DEVELOPMENT, COMPARED TO *DANIO RERIO*

<i>Astyanax</i> (23°C)	Developmental Landmarks	<i>Zebrafish</i> (28.5°)
0 hpf	1-cell stage	0 hpf
0.75 hpf	2-cell stage	0.75 hpf
1 hpf	4-cell stage	1 hpf
1.25 hpf	8-cell stage	1.25 hpf
1.5 hpf	16-cell stage	1.5 hpf
1.75 hpf	32-cell stage	1.75 hpf
2 hpf	64-cell stage	2 hpf
3.75 hpg	1000-cell stage (YSL)	3 hpf
6 hpf	Shield formation	6 hpf
10.5 hpf	Beginning of somitogenesis	10.33 hpf
12 hpf	Eye formation	12 hpf
14 hpf	Otic vesicle becomes visible	19 hpf
15.5 hpf	Otic vesicle with central depression	
16 hpf	Early motility (first muscle contraction)	36 hpf
18 hpf	Otolith development	22 hpf
18 hpf	Very thin casquette becomes visible	
18.5 hpf	Lens becomes visible	19 hpf
21 hpf	Heart beat; early pigmentation	24 hpf
24 hpf	End of somitogenesis	25 hpf
24.5–28 hpf	Hatching	48 hpf
1.5 dpf–2.7 mm SL	Pectoral fin bud	42 hpf
3.5 dpf–4 mm SL	Jaws formation	60 hpf–3.4 mm SL
4.5 dpf–4 mm SL	Casquette disappearance	3.5 mm SL
	Formation of swim bladder	
4–5 mm SL	Yolk complete regression	6.5 mm SL
5–6 mm SL	Caudal fin ray appearance	4.9 mm SL
5.5 dpf–3.9 mm SL	Inflated swim bladder	3.7 mm SL
6–7 mm SL	Anal fin ray appearance	6.3 mm SL
8.5 mm SL	Adipose fin bud appearance	
8.5 mm SL	Pelvic fin bud appearance	7.5 mm SL

10.5 hpf, a time which also corresponds to the appearance of the first somite (Fig. 4). Somitogenesis proceeds synchronously in the two populations (Figs. 4 and 5), with one pair of somites added every 20 min. Neurulation begins between 9.6 and 9.9 hpf, with a visible thickening of the anterior neural plate (Fig. 6). All subsequent developmental milestones are also synchronous in the two populations (Table 1). The eye starts developing at 12 hpf, when 5–6 somites are visible. The otic vesicle becomes visible around 13–14 hpf (8–12 ss), and a central depression is dug at 16–17 hpf (16–12 ss). Around the same time, the embryo starts moving with uncontrolled contractions in the chorion. The tail starts detaching from the yolk and is completely free from any yolk streak around 23 hpf. The casquette, a transient adhesive gland located on

the head of the young larvae,<sup>17</sup> becomes visible as a very thin ectodermal thickening at 18 hpf. The lens is visible half an hour later. The heart starts beating around 21 hpf. The larvae hatch between 24.5 and 28 hpf (Fig. 4, Table 1).

*Astyanax* embryonic development at 23°C therefore strongly resembles that of *Danio rerio* at 28.5°C,<sup>2</sup> but is significantly quicker from 12 hpf onwards. Its development is even faster at 28°C. Indeed, at 28°C embryos progress from shield to bud stage in 2.5 h, which normally takes 4 h at 23°C (data not shown). However, at this temperature the survival rate is low, and as such, 23°C appears to be the ideal temperature at which to maintain embryos. Surface and Pachón cavefish embryos have a completely synchronous development until hatching. The early development of Pachón×surface hybrid embryos is synchronous as well (Supplementary Fig. S1; Supplementary data are available online at [www.liebertonline.com/zeb](http://www.liebertonline.com/zeb)). The only difference between the two types of embryos is with respect to pigmentation: Pachón embryos remain unpigmented, whereas the eye and yolk of surface fish embryos start showing pigment cells (black melanophores) between 19 and 23 hpf (Fig. 4, Table 1).

Another intriguing variation between these embryos is the color of the yolk from spawning time: surface embryos are completely transparent, whereas Pachón embryos are slightly orange while remaining translucent (Fig. 3). We hypothesized that this difference could stem from feeding differences in breeding adults in our facility (see Methods). We performed paper chromatography of cave and surface food jointly with spinach extracts used as a reference (Supplementary Fig. S2). This analysis showed that adult cavefish food contains carotenes while surface fish food does not. Thus, the orange coloration of the cavefish yolk could be the result of carotene reserves. Paper chromatography of cave and surface egg extracts showed that cave eggs contain xanthophylls, raising the possibility that cave females oxygenate carotenes from their food and incorporate the resulting xanthophylls into their eggs (Supplementary Fig. S2). This would explain why hybrid embryos also appear yellowish (Supplementary Fig. S1), as the mother of these hybrids is a Pachón cavefish.

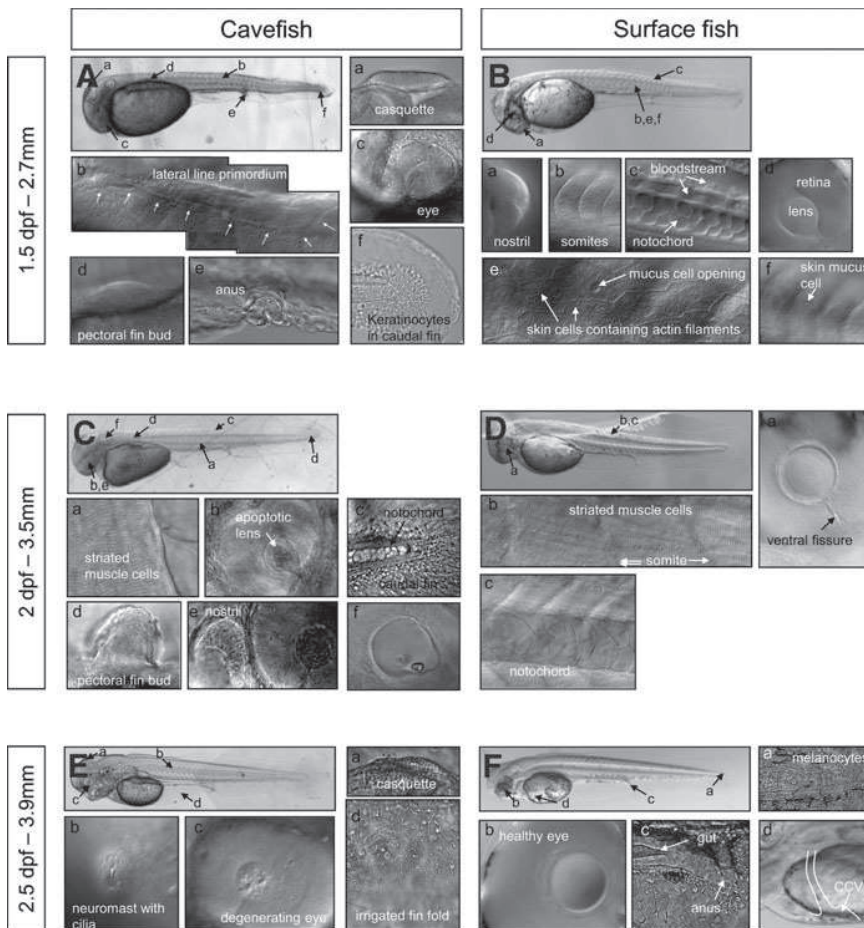
#### Larval development

After hatching, *Astyanax* larvae are first twisted but then straighten within half an hour. They possess 40 somites, the definitive number being reached at 25 hpf (Figs. 5 and 7Bb). Zebrafish on the other hand reach 30–32 somites at 25 hpf and hatch at 48 hpf.<sup>2,21</sup> Most *Astyanax* sensory organs are functional upon hatching: the otic vesicle is well developed with 2 otoliths (appeared at 18 hpf (Fig. 4)), the casquette is smooth and sticky (Fig. 7Aa), the lateral line primordium can be seen along the larva body (Fig. 7Ab), nostrils are open (Fig. 7Ba), the lens and retina are clearly recognizable (Fig. 7Bd), with the ventral quadrants missing or reduced in cave larvae (Fig. 7Ac).<sup>16</sup> Certain other structures can be documented: the cloaca is formed (Fig. 7Ae) but the rest of the digestive tract cannot be recognized. A pectoral fin bud can be seen along the yolk (Fig. 7Ad). Cells of the notochord are round and do not overlap (Fig. 7Bc). Skin differentiation is nearly complete: keratinocytes aggregate in the caudal fin (Fig. 7Af) and mucus cells can be seen in the epidermis (Figs. 7Be and 7Bf).

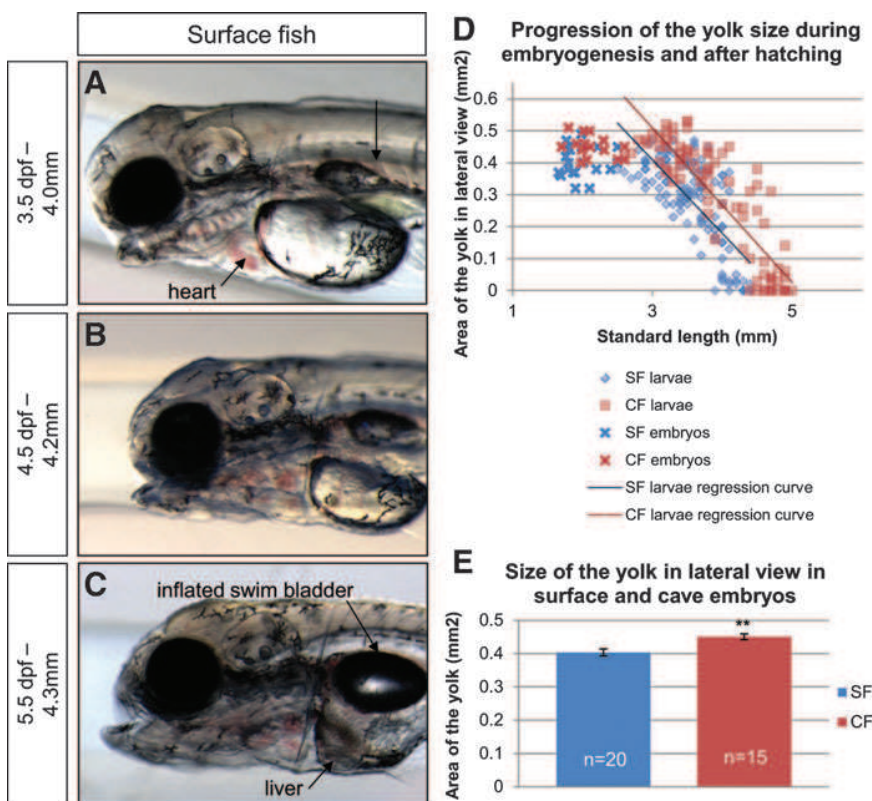
Half a day later at 2 dpf (Figs. 7C and 7D), larvae have grown (2.7 to 3.5 mm standard length), as has the pectoral fin







**FIG. 7.** Early larval development. Cavefish (**A, C, E**) and surface fish (**B, D, F**) embryos in lateral views, at 1.5 dpf (**A, B**), 2 dpf (**C, D**), and 2.5 dpf (**E, F**). In all images, anterior is left and dorsal is up. Images of anatomical details are shown and located on the global view, and captions are written in full on the pictures. CCV stands for common cardinal vein, also called duct of Cuvier.



**FIG. 8.** Yolk regression during the first days of larval life. (**A–C**) Surface fish larvae in lateral view at 3.5 dpf, 4.5 dpf, and 5.5 dpf. The black arrow in **A** indicates the forming swim bladder. (**D**) Quantification of the yolk size and its progressive disappearance, as seen in lateral view, in surface (*blue symbols*) and cave (*red symbols*) embryos and larvae. (**E**) Mean size of the yolk in surface and cave embryos from 10 to 20 hpf. Statistical significance was calculated using Mann-Whitney test.



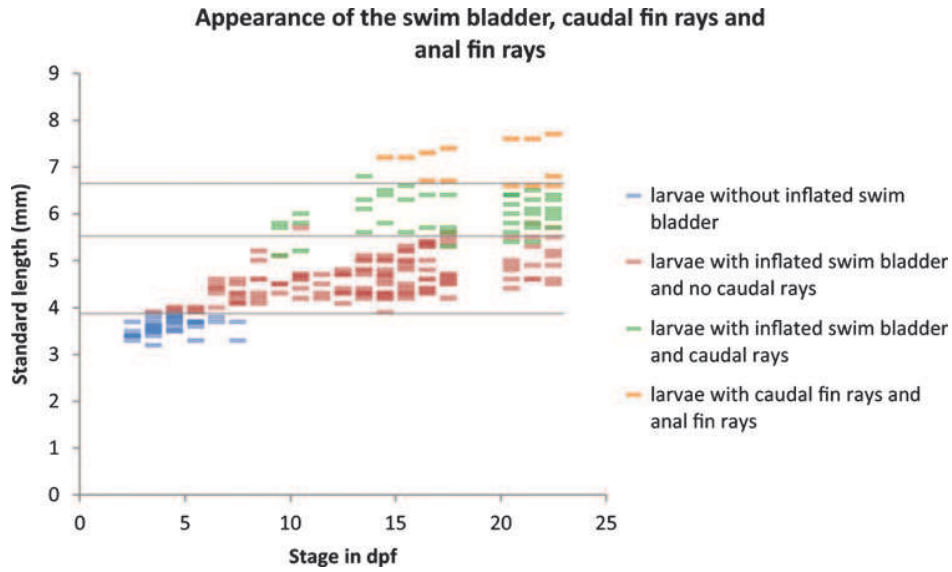


FIG. 9. Standard length-dependence of certain larval characteristics. Surface fish larvae reared at 23°C or 28°C and at different population densities (from 5 to 150 per 60 mm dish) were assessed for the appearance of certain larval characteristics and reported as a function of age (*x-axis*) and SL (*y-axis*) during 3 weeks. Colors indicate swim bladder inflation (*red*), appearance of caudal (*green*), and anal (*orange*) fin rays, as indicated on the *right*.

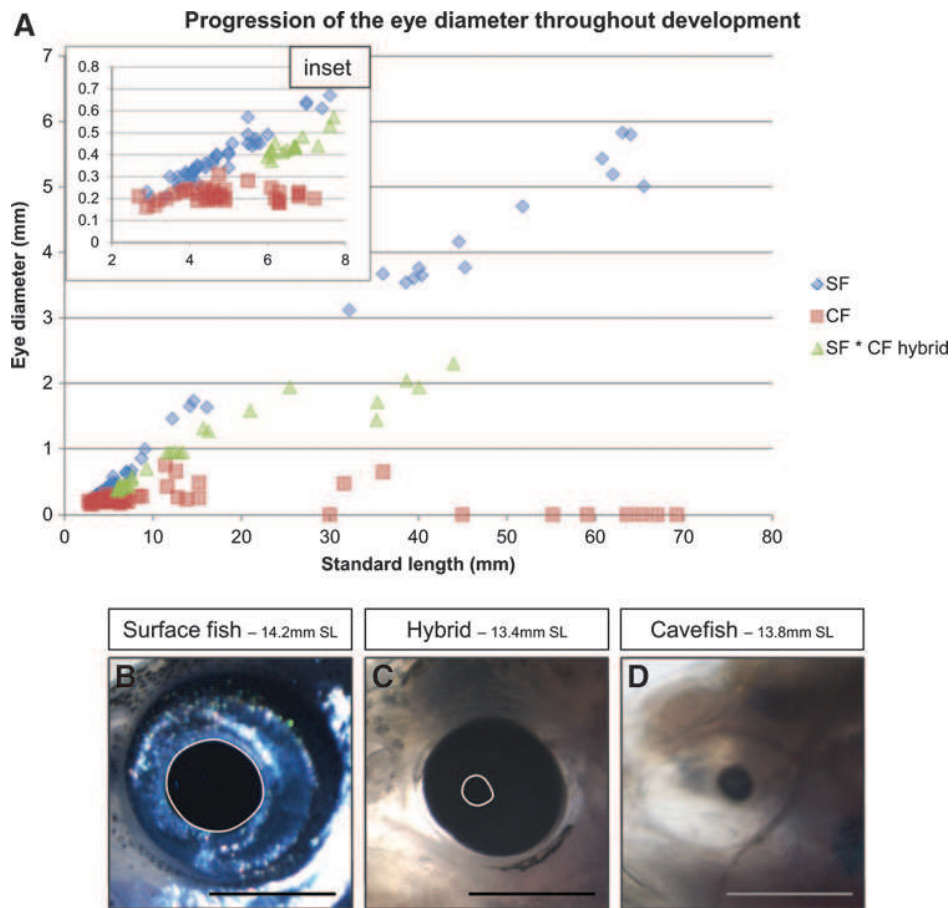
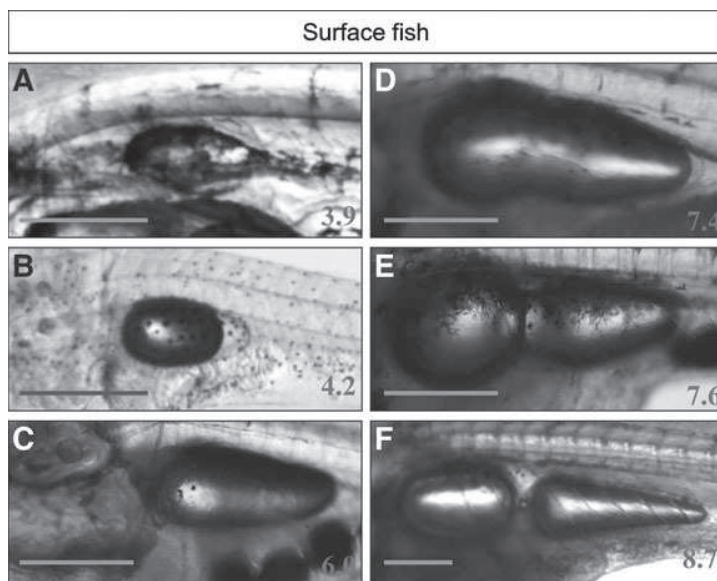


FIG. 10. Eye size during development. (A) Quantification of eye diameter in surface (*blue*), cave (*red*), and F1 hybrid (*green*) larvae, as a function of standard length. The *inset* shows a magnification of the measures for early embryos. (B–D) Pictures of the eye of equally sized surface (B), hybrid (C), and cave (D) fishes. *Solid lines* outline the lens. In cavefish, the degenerated eye appears slightly dark because it is a cyst of high density, which makes it difficult for the transmitted light to cross. The scale bar represents 1 mm.





**FIG. 11.** Swim bladder development. (A–F) Pictures of surface fish larvae in lateral views, with the anterior side on the left. Their standard lengths (SL) are indicated on the bottom right corner of the pictures. The scale bar represents 500  $\mu\text{m}$ .

bud (Fig. 7Cd). The cells of the notochord are bigger, overlapping, and polygonal in shape (Figs. 7Cc and 7Dc). Striated muscle cells are clearly visible (Figs. 7Ca and 7Db). Blood appears clearly red in vessels (not shown but see Fig. 8). The apoptotic lens of the cave larvae appears rippled (Figs. 7Cb and 7Ce), in contrast with the smooth and healthy lens of surface larvae (Fig. 7Da).

At 2.5 dpf (Figs. 7E and 7F), larvae begin to develop jaws. Neuromasts with their cilia can be observed along the lateral line (Fig. 7Eb). The casquette is usually bumpier than at 1.5 dpf (Fig. 7Ea). In the cavefish degenerating eye, the lens is barely recognizable (Figs. 7Ec and 7Fb). The digestive tract is almost complete (Fig. 7Fc). In surface fish, star-shaped melanocytes can be seen in the skin (Fig. 7Fa). The vitelline blood circulation of the larvae strikingly resembles that of zebrafish but not medaka,<sup>22,23</sup> with a single common cardinal vein on the yolk (Fig. 7Fd, Supplementary Video SV1; Supplementary Video is available on [www.liebertpub.com/zeb](http://www.liebertpub.com/zeb)).

At 3.5 dpf, the casquette is completely degenerated (Fig. 8A). The swim bladder becomes visible as a deflated pouch (Fig. 8A). It will inflate only at 5.5 dpf, when the digestive tract is complete and larvae start feeding. At this time the yolk, which has progressively reduced since hatching, has mostly disappeared (Figs. 8A–8C). Yolk regression proceeds linearly from hatching, until complete disappearance when larvae reach 4.5–5 mm standard length (Fig. 8D). Cave embryos possess a slightly larger yolk and use it at the same rate as surface larvae, so that yolk disappears later in cave larvae (Figs. 8D and 8E). This confirms previous reports of bigger eggs in subterranean *Astyanax*.<sup>24,25</sup>

The larger the larvae become, the more their growth and development depends on the space they occupy and the density of the population in which they are reared. For instance, a 2-month-old larva can measure from 6 to 20 mm, depending on the water volume, the population density, the temperature, and the amount of food available. The definitive adult size (6–7 cm) is reached within 1 to 3 years. Most characteristics depend on the standard length (SL) of larvae rather than their age. For example, the swim bladder inflation can

occur between 3.5 and 7.5 dpf, but is always achieved at 3.9 mm SL (Fig. 9, red dots). The appearance of caudal fin rays and anal fin rays also depends on standard length (Fig. 9, green and orange dots, respectively). Thus, the relevant measure to stage the larvae is the standard length, and not the age, as in zebrafish.<sup>26</sup> In all of the following figures, observed characteristics will therefore be analyzed as a function of the standard length.

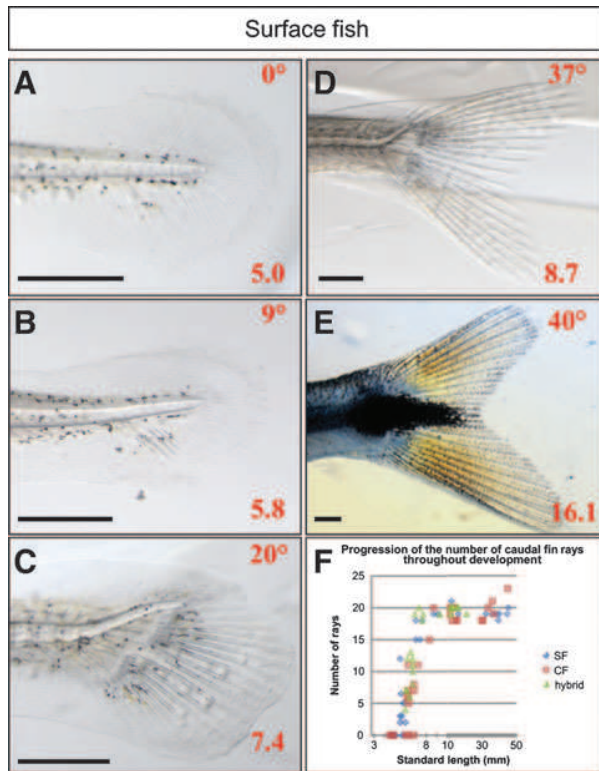
#### Eye development

One major difference between surface and cave adult fish is the presence or absence of an eye. The degeneration of the cavefish eye was monitored throughout larval development to adulthood, by measuring the diameter of the eyes of surface, Pachón cave and F1 hybrid larvae, and young adults (Figs. 2 and 10A). Cavefish eyes undergo almost normal morphogenesis (see also Fig. 4) and grow during the first days of larval development, but the eye diameter never exceeds 0.3 mm (Fig. 10A inset), and eventually decreases to zero. In contrast, surface fish eyes undergo continuous growth until adulthood. F1 hybrid eyes also grow until adulthood, but at all stages they are smaller than surface fish eyes, as previously shown.<sup>27</sup> For illustration, pictures of surface, cave, and hybrid eyes of approximately 14 mm SL larvae are shown (Figs. 10B–10D).

#### Swim bladder development

The swim bladder develops the same way in surface, cave, and hybrid larvae. At approximately 4 mm SL it inflates, and then grows antero-posteriorly (Figs. 9 and 11). A bud appears anteriorly when the larvae reach about 7 mm SL and gives rise to the anterior swim bladder. Around 8.5 mm SL, anterior and posterior swim bladders are connected only by a thin tube, as in adults. This is the same type of development as seen in *Danio rerio*, even if corresponding standard lengths differ,<sup>26</sup> as adult zebrafish are much smaller than *Astyanax mexicanus*.





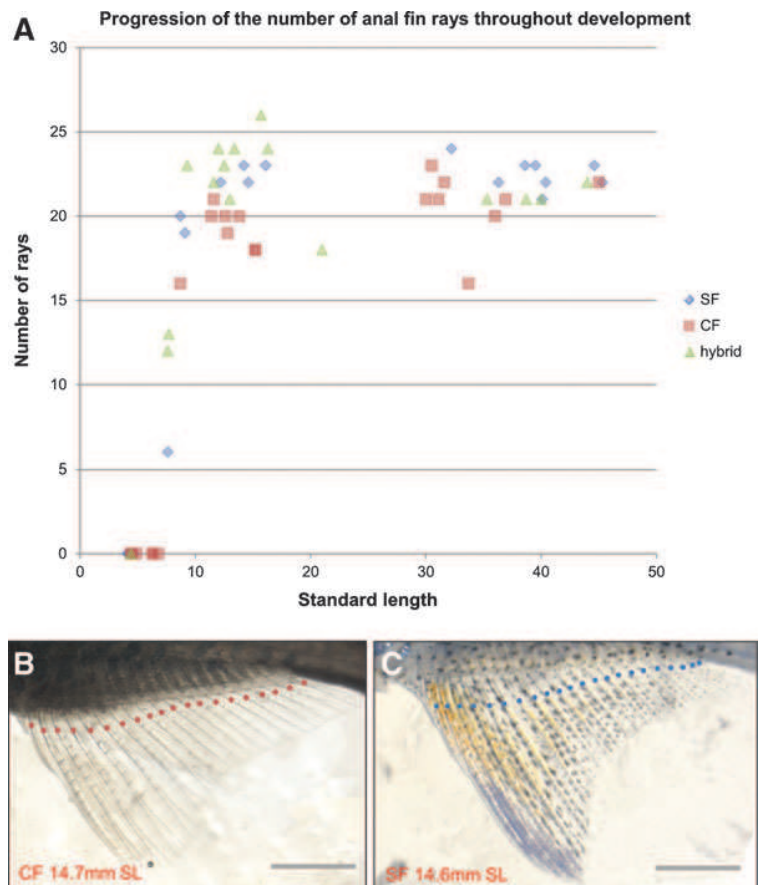
*Fin development*

The caudal fin is the first to develop, with the first rays appearing around 5 mm SL (Fig. 12). The notochord progressively bends dorsally so that the spine is found finally only in the dorsal part of the fin. The definitive number of rays (20 rays, with some inter-individual variation observed) is reached at 9 mm SL in all populations (Fig. 12G). Hybrid and surface larvae develop the same way, with pigmentation appearing progressively: first, a central black melanophore spot together with melanophores between the rays; and then, xanthophores appear on the entire fin (Figs. 12A–12F). In contrast, cave fish are never pigmented but development of the fin structure as a function of length follows the same time course as surface and hybrid larvae.

The anal fin appears at 7 mm SL. Cave fish were reported to possess fewer anal fin rays as adults than surface fish,<sup>28</sup> which

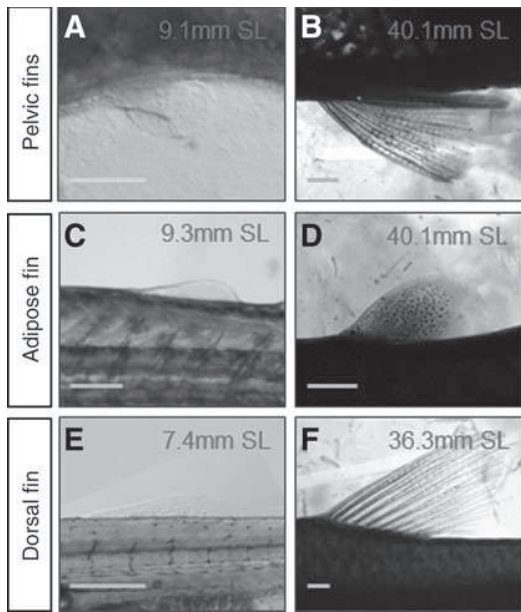
←  
**FIG. 12.** Caudal fin development. (A–E) Surface fish larvae caudal fins in lateral views, with standard lengths indicated at the *bottom right* of each picture. The bending angle of the notochord is indicated in the *top right corner* of each picture. The scale bars represent 500  $\mu$ m. (F) Quantification of the number of caudal fin rays as a function of standard length in surface (blue), hybrid (green), and cavefish (red).

**FIG. 13.** Anal fin development. (A) Quantification of the number of anal fin rays as a function of standard length in surface, hybrid, and cavefish. (B) Cavefish anal fin, with red dots indicating the rays. (C) Surface fish anal fin, with blue dots indicating rays. The scale bars represent 1 mm.





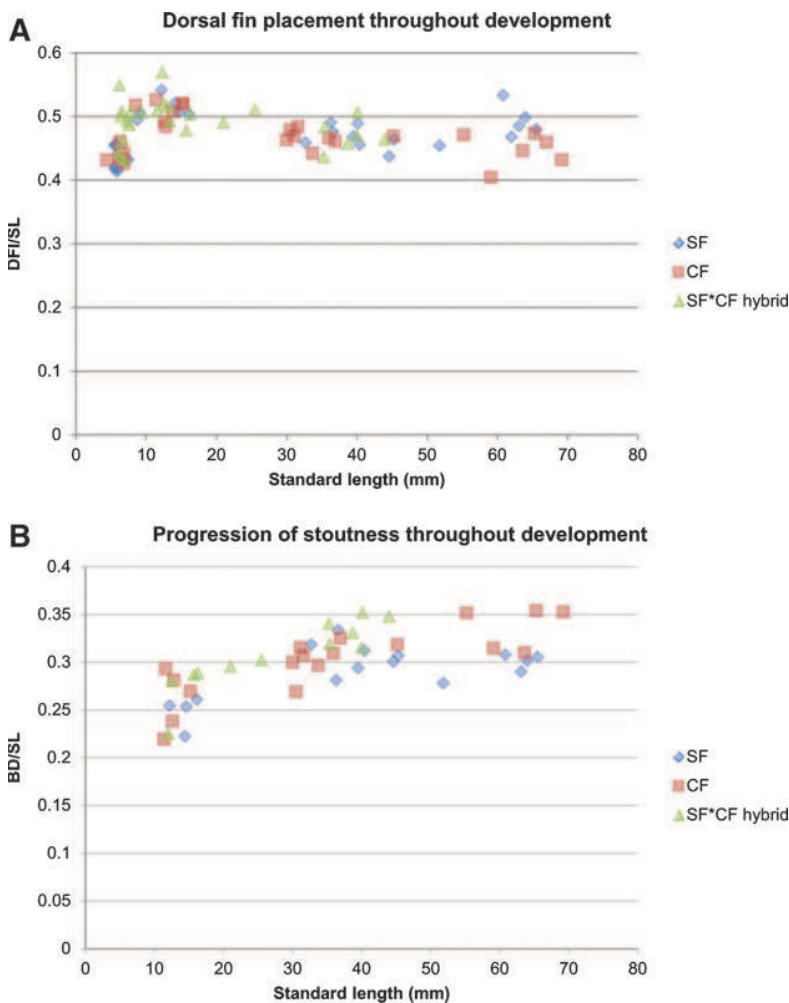




is why we analyzed anal fin ray number throughout development. The definitive number of anal fin rays is reached at 15 mm SL approximately (around 23 rays), and is indeed slightly lower in cave fish (around 20 rays) (Fig. 13). Similarly F1 hybrids tend to have only 20 rays.

The pelvic fin buds appear at 9 mm SL, and rays are formed at 11.5 mm SL (Figs. 14A and 14B). The adipose fin, a fleshy fin located posteriorly to the dorsal fin, also appears as a bud at 9 mm SL and remains without rays (Figs. 14C and 14D). This special type of fin can be found in characids but also in lizardfishes (Synodontidae), Siluriforms, and salmonids (Salmonidae).<sup>29,30</sup> Finally, the dorsal fin, consisting of 10 or 11 rays, first appears at 8 mm SL and all rays are present around 10mm SL (Figs. 14E and 14F).

←  
**FIG. 14.** Pelvic, adipose, and dorsal fin development. Pictures of pelvic fins (A, B), adipose fins (C, D), and dorsal fins (E, F) in surface fish of various standard lengths. The scale bars represent 250  $\mu$ m in A, C, E, and 1 mm in B, D, F.



**FIG. 15.** Global body shape. (A) Quantification of the placement of the dorsal fin along the body axis (see Fig. 2 for Methods) as a function of the standard length. (B) Quantification of body stoutness as a function of the standard length. For adult specimens (above 40 mm SL), the values are always higher for cavefish.



### Development of global body shape

The dorsal fin has previously been reported to be positioned more posteriorly in Pachón fish than in surface fish.<sup>28</sup> We measured its placement throughout development but were unable to confirm this observation: our data, obtained with projection on the body axis to correct for differences in corpulence between the two populations (Fig. 2) show identical dorsal fin placement in surface, Pachón cave, and F1 hybrid fishes (Fig. 15A). We also quantified stoutness (body depth divided by SL, Fig. 2). As expected from general observations and from the fact that Pachón are fatter than surface fish (at least in laboratory conditions), for individuals with SL above 40 mm, Pachón fish were more corpulent than surface fish (Fig. 15B). Thus, the QTL reported by Protas et al. (2008) may be related to a difference in growth and global body shape, rather than to a difference in dorsal fin placement in cavefish.

### Conclusion

*Astyanax mexicanus* embryonic development is very fast: a swimming larva hatches one day after fertilization at 23°C. Embryos and early larvae are totally transparent, allowing for live imaging as well as high quality molecular histology. Surface fish and Pachón cavefish embryos and larvae exhibit a strictly synchronous development, allowing rigorous comparisons between these two populations both during embryogenesis and in later development. In the laboratory, embryos and larvae of each population are nevertheless easily recognizable by the color and shape of early embryos, the presence or absence of pigmentation, and the morphology of the eye. Some very slight variations between individuals can sometimes be observed, mostly in cavefish. During development, somitogenesis proceeds with some interindividual variation (Fig. 5), and cavefish embryos are globally more variable than surface fish embryos. This is also true for the eye development (Fig. 10) and for all molecular markers studied so far. On the other hand, adults within a single population differ only in gender-dependent body shape (females have a rounder belly than males), and, for surface fish, by pigmentation influenced by the social status (dominant individuals have more intense orange spots on the anal fin). Together with the facts that 1) *Astyanax* is easy to propagate and regularly provides a large number of embryos, 2) surface and cave fishes can breed and allow genetic approaches, and 3) the evolutionary history of the different populations is known, the developmental features we have described here contribute to the making of *Astyanax mexicanus* an excellent model for evolutionary developmental biology, as well as for developmental biology *per se*. The current limitations of the model for transcriptomics, genomics, and transgenesis should also be overcome in the very near future.

### Acknowledgments

Work supported by an ANR grant (ASTYCO) to SR. Thanks to Philippe Herbomel with whom we “traveled” through *Astyanax* larvae under Nomarski optics at the early stages of the project. We also wish to thank Matthieu Simion and the animal facility staff for help and advice in fish care, and Heather McLean for improvement of our English.

### Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

### References

- Iwamatsu T. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mech Develop* 2004;121:605–618.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 1995;203:253–310.
- Swarup H. Stages in the development of the stickleback *Gasterosteus aculeatus* (L.). *J Embryol Exp Morph* 1958;6:373–383.
- Briggs JC. The biogeography of otophysan fishes (*Ostariophysi:Otophysi*): A new appraisal. *J Biogeogr* 2005;32:287–294.
- Peng Z, He S, Wang J, Wang W, Diogo R. Mitochondrial molecular clocks and the origin of the major Otocephalan clades (Pisces: Teleostei): A new insight. *Gene* 2006;370:113–124.
- De Filippi F. Nouvelles espèces de poissons. *Revue Magasin Zoologie*. 1853; (Serie 2) volume 5: 164–171.
- Mitchell RW, Russell WH, Elliott WR. Mexican eyeless characin fishes, genus *Astyanax*: Environment, distribution, and evolution. *Spec Publ Mus Texas Tech Univ* 1977;12:1–89.
- Jeffery WR. Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. *Dev Biol* 2001;231:1–12.
- Jeffery WR. Emerging model systems in evo-devo: Cavefish and microevolution of development. *Evol Dev* 2008;10:265–272.
- Wilkins H. Evolution and genetics of epigeal and cave *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). Support for the neutral mutation theory. In: Hecht, MK, Wallace, B (Eds) *Evolutionary Biology* vol 23 Plenum, New York and London. 1988:271–367.
- Strecker U, Bernatchez L, Wilkins H. Genetic divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Mol Ecol* 2003;12:699–710.
- Strecker U, Faundez VH, Wilkins H. Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. *Mol Phylogen Evol* 2004;33:469–481.
- Jeffery W. Regressive evolution in *Astyanax* cavefish. *Ann Rev Gen* 2009 43:25–47.
- Alunni A, Menuet A, Candal E, Penigault JB, Jeffery WR, Retaux S. Developmental mechanisms for retinal degeneration in the blind cavefish *Astyanax mexicanus*. *J Comp Neurol* 2007;505:221–233.
- Menuet A, Alunni A, Joly JS, Jeffery WR, Retaux S: Expanded expression of Sonic Hedgehog in *Astyanax* cavefish: Multiple consequences on forebrain development and evolution. *Development* 2007;134:845–855.
- Pottin K, Hinaux H, Retaux S: Restoring eye size in *Astyanax mexicanus* blind cavefish embryos through modulation of the Shh and Fgf8 forebrain organising centres. *Development* 2011;138:2467–2476.
- Pottin K, Hyacinthe C, Retaux S. Conservation, development, and function of a cement gland-like structure in the fish *Astyanax mexicanus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:17256–17261.
- Yamamoto Y, Byerly MS, Jackman WR, Jeffery WR. Pleiotropic functions of embryonic sonic hedgehog expression link jaw and taste bud amplification with eye loss during cavefish evolution. *Dev Biol* 2009;330:200–211.
- Yamamoto Y, Jeffery WR. Central role for the lens in cave fish eye degeneration. *Science* 2000;289:631–633.



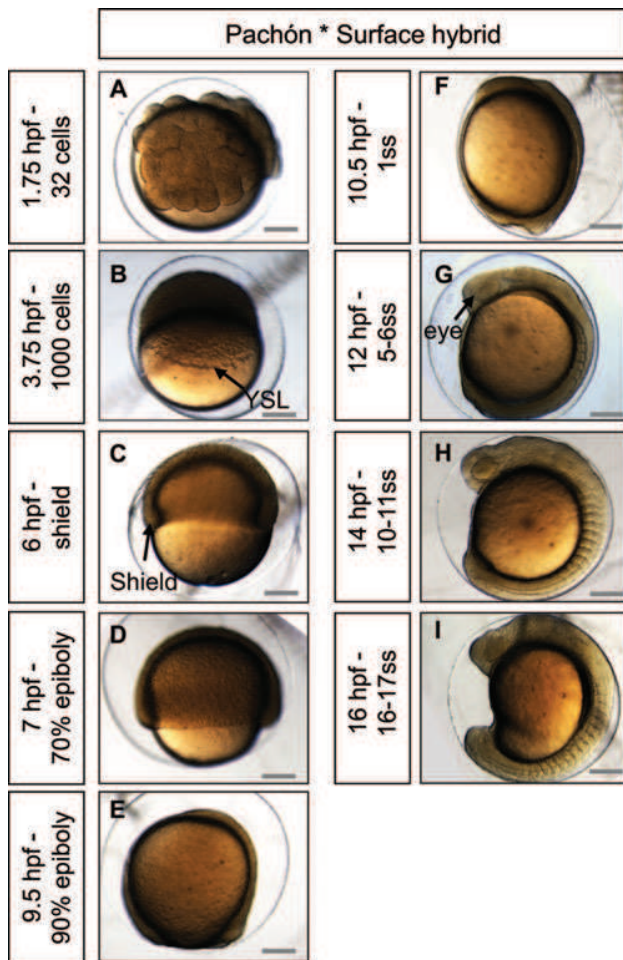
20. Yamamoto Y, Stock DW, Jeffery WR. Hedgehog signalling controls eye degeneration in blind cavefish. *Nature* 2004;431:844–847.
21. Holley SA. The genetics and embryology of zebrafish metamorphism. *Dev Dyn* 2007;236:1422–1449.
22. Fujita M, Isogai S, Kudo A. Vascular anatomy of the developing medaka, *Oryzias latipes*: A complementary fish model for cardiovascular research on vertebrates. *Dev Dyn* 2006;235:734–746.
23. Isogai S, Horiguchi M, Weinstein BM. The vascular anatomy of the developing zebrafish: An atlas of embryonic and early larval development. *Dev Biol* 2001;230:278–301.
24. Hüppop K. Phänomene und Bedeutung der Energieersparnis bei dem Höhlenfisch *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). Thesis, Universität Hamburg, 1988.
25. Hüppop KaW, H. Bigger eggs in subterranean *Astyanax fasciatus* (Characidae, Pisces). *Zool Syst Evolut* 1991;29:280–288.
26. Parichy DM, Elizondo MR, Mills MG, Gordon TN, Engeszer RE. Normal table of postembryonic zebrafish development: Staging by externally visible anatomy of the living fish. *Dev Dyn* 2009;238:2975–3015.
27. Borowsky R. Restoring sight in blind cavefish. *Curr Biol* 2008;18:R23–24.
28. Protas M, Tabansky I, Conrad M, Gross JB, Vidal O, Tabin CJ, et al. Multi-trait evolution in a cave fish, *Astyanax mexicanus*. *Evol Dev* 2008;10:196–209.
29. Fishbase. <http://www.fishbase.org/search.php> (last accessed November 2011).
30. Helfman GS, Collette BB, Facey DE, Bowen BW. The diversity of fishes. Biology, evolution, and ecology. Wiley Blackwell publishers. 2009; Second Edition.

Address correspondence to:  
Sylvie Rétaux, Ph.D.  
UPR 3294 N&D Laboratory  
Institut de Neurobiologie Alfred Fessard  
CNRS  
Avenue de la Terrasse  
91198 Gif-sur-Yvette cedex  
France  
E-mail: [retaux@inaf.cnrs-gif.fr](mailto:retaux@inaf.cnrs-gif.fr)

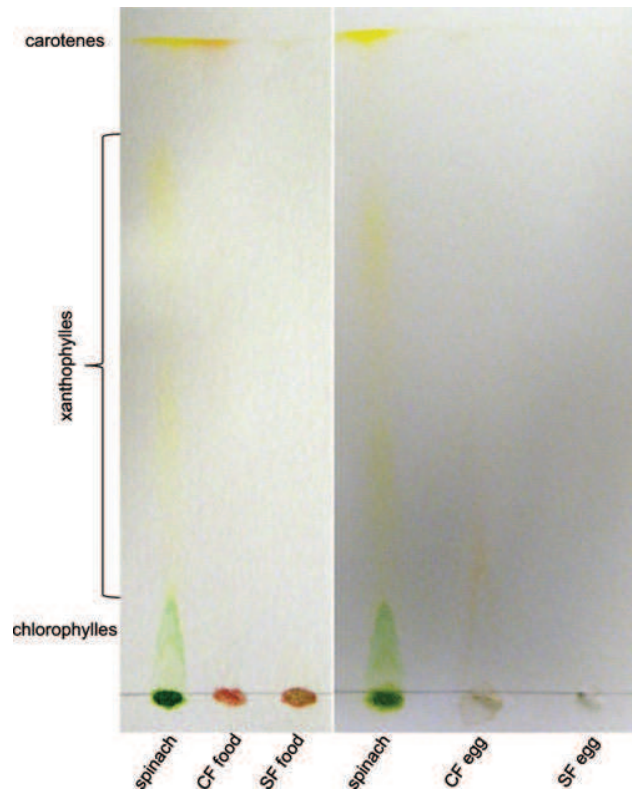


## Supplementary Data

**SUPPLEMENTARY VIDEO S1.** Blood circulation on the yolk. Short movie of a surface fish larva, first shown at normal speed and then at half normal speed. CCV stands for common cardinal vein, also called the duct of Cuvier.



**SUPPLEMENTARY FIG. S1.** Development of *Astyanax mexicanus* female Pachón × male surface F1 hybrid embryos from zero to 16 hpf. (A–I) Hybrid embryos at stages indicated on the left, in lateral views (B–D) or view from the animal pole (A). The yolk syncytial layer (B), the embryonic shield (C), and the eye (G) are indicated by arrows. The scale bars represent 200 μm. Compare with Figures 3 and 4.



**SUPPLEMENTARY FIG. S2** Chromatography of pigments contained in *Astyanax mexicanus* food and eggs. Spinach pigments are used as a control for migration. CF food stands for cavefish food and SF food for surface fish food (see Materials and Methods).





# Résumé

L'*Astyanax mexicanus* est un poisson téléostéen utilisé dans les études de microévolution. Au sein de la même espèce, il existe plusieurs populations. Des poissons de surface (SF), vivant en banc dans les rivières d'Amérique Centrale et plusieurs populations cavernicoles (CF), vivant dans l'obscurité des grottes mexicaines. La majorité des populations cavernicoles sont indépendantes et ont dérivé des populations de surface depuis environ un million d'années. Les CF sont aveugles et dépigmentés. D'un point de vue comportemental, les CF ont, entre autres, perdu l'agressivité qui est un caractère important des SF. Ce travail caractérise finement les différences comportementales entre poissons de surface et cavernicoles, et analyse les modifications des circuits neuronaux qui sont à l'origine de la perte du comportement agressif chez les poissons cavernicoles.

Les tests d'agressivité montrent que deux SF s'attaquent dix fois plus que deux CF. La distribution temporelle des attaques diffère également entre les populations. En effet, la majorité des attaques entre CF ont lieu lors des premières minutes du test, alors que chez les SF la fréquence des attaques augmente au cours du temps. L'étude de l'agressivité de SF rendu aveugle ou dans le noir montre que la perte d'agressivité chez les CF n'est pas due au phénotype aveugle. De plus, l'agressivité des poissons hybrides suggère que le comportement agressif des SF est génétiquement codé.

Après des expériences pharmacologiques utilisant des composés interférant avec le système sérotoninergique ou soumettant les SF et les CF à différents régimes alimentaires, nous faisons l'hypothèse selon laquelle la perte d'agressivité des CF est une adaptation à la vie cavernicole, ceux-ci recherchant en permanence de la nourriture. En revanche, l'agressivité des SF est étroitement liée à la hiérarchie existant au sein du banc, la dominance étant elle-même liée en partie à la concentration de la sérotonine présente au niveau du raphé. La concentration de sérotonine est inversement corrélée à l'agressivité.

D'un point de vue neuroanatomique, l'organisation du système sérotoninergique est similaire entre les populations. Cependant, l'un des noyaux hypothalamiques est plus large chez les CF et contient plus de neurones. Par ailleurs, l'agressivité et le taux de sérotonine sont connus pour être inversement corrélés chez les vertébrés. De fait, des traitements pharmacologiques augmentant le taux de sérotonine diminuent l'agressivité des SF et modifient leur profil d'agressivité, mimant celui des CF.

Cependant, le système sérotoninergique n'est pas le seul à être modifié dans le système nerveux des CF. En réalité, les dosages HPLC montrent que l'ensemble des systèmes aminergiques est amplifié chez les CF, conduisant à l'apparition d'un phénotype « hyperaminergique ». Les études neuro-anatomiques et enzymologiques des systèmes sérotoninergiques et catécholaminergiques montrent que des variations du nombre de neurones et de l'activité des enzymes de dégradation des neurotransmetteurs aminergiques convergent vers cette amplification et sont à l'origine de ce phénotype.

Par ailleurs, et en parallèle, les méthodes de transgénèses stables ont été testées chez l'*Astyanax*. Cette étude montre que l'utilisation des méganucléases et des transposons sont utilisables chez notre poisson modèle et permettent l'établissement de lignées transgéniques. Cet outil permettra de tester à l'avenir l'importance et la fonction des gènes d'intérêt lors du développement du système nerveux, ainsi que lors de la mise en place des comportements.