



HAL
open science

Évolution et diversité des structures minéralisées chez les sélaciens : approche paléo-développementale

Sébastien Enault

► **To cite this version:**

Sébastien Enault. Évolution et diversité des structures minéralisées chez les sélaciens : approche paléo-développementale. Evolution [q-bio.PE]. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONTTS234 . tel-02067814

HAL Id: tel-02067814

<https://theses.hal.science/tel-02067814>

Submitted on 14 Mar 2019

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 de Montpellier

Institut des Sciences de l'Evolution

Ecole doctorale Sibaghe

Évolution et diversité des structures minéralisées chez les sélaciens : Approche paléo-développementale

manuscrit présenté par

Sébastien Enault

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Montpellier

Soutenu le 10 Décembre 2015

Jury :

Pr. Philippe	JANVIER	Muséum National d'Histoire Naturelle	Rapporteur
Pr. Ann	HUYSEUNE	Université de Gand	Rapporteur
Dr. Tatjana	HAITINA	Université d'Uppsala	Examinatrice
Pr. Pierre-Olivier	ANTOINE	Université de Montpellier	Président du jury
Dr. Sylvain	ADNET	Université de Montpellier	Directeur
Dr. Mélanie	DEBIAIS-THIBAUD	Université de Montpellier	Co-Directrice
Dr. Julien	CLAUDE	Université de Montpellier	Invité

Liste des abréviations utilisées dans les figures

<i>A.</i> : Aiguillon	<i>L.d.</i> : Lame dentaire
<i>Am.</i> : Améloblastes	<i>M.d.</i> : Matrice de la dentine
<i>A.n.</i> : Arc neural	<i>M.e.</i> : Matrice de l'émailloïde
<i>A.h.</i> : Arc hémal	<i>Mes.</i> : Méenchyme
<i>B.i.</i> : Barre ischiopubique	<i>M.d.</i> : Matrice de la dentine
<i>Bp.</i> : Basiptérygium	<i>Ms.</i> : Mésoptérygium
<i>BCE</i> : (Bundled Crystallite Enameloid)	<i>Mt.</i> : Métapterygium
<i>C.</i> : Centrum	<i>No.</i> : Notochorde
<i>Ch.</i> : Chondrocytes	<i>Or.</i> : Orthodentine
<i>C.i.</i> : Cartilage intermédiaire	<i>Os.</i> : Ostéodentine
<i>C.M.</i> : Cartilage de Meckel	<i>Od.</i> : Odontoblastes
<i>C.p.</i> : Cavité pulpaire	<i>Pa.</i> : Palatocarré
<i>C.t.</i> : Cartilages terminaux	<i>PAS</i> : Periodic Acid Schiff (éventuellement couplé à du bleu alcian (BA))
<i>C.v.</i> : Colonne vertébrale	<i>PBE</i> : <i>Parallel Bundle Enameloid</i>
<i>D.d.</i> : Denticule dermique	<i>PCS</i> : Écailles primaires caudales (Primary Caudal Scales)
<i>De.</i> : Dentine	<i>Pc.</i> : Périchondre
<i>D.f.</i> : Dent/denticule fonctionnel	<i>PDS</i> : Écailles primaires dorsales (Primary Dorsal Scales)
<i>D.r.</i> : Dents de remplacement	<i>P.d.</i> : Plaques dentaires
<i>EDJ</i> : Enameloid-Dentine Junction	<i>Pr.</i> : Proptérygium
<i>Em.</i> : Emailloïde	<i>Pt.</i> : Ptérygopode
<i>Ep.</i> : Epithelium	<i>Ra.</i> : Radiaux
<i>F.g.</i> : Fibres géantes	<i>R.e.</i> : Rayons épicaux
<i>HES</i> : Hématoxyline-Eosine-Safran	<i>R.h.</i> : Rayons hypocordaux
<i>I.n.</i> : Interneural	
<i>L.b.</i> : Lame basale	

RBE : (Radial Bundle Enameloid)

RET : Réticuline

SCE : (Single Crystallite Enameloid)

TBE : (Tangled Bundle Enameloid)

TM : Trichrome de Masson

T.n. : Tube neural

Z.c. : Zone de calcification

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury : Philippe Janvier, Ann Huysseune, Pierre-Olivier Antoine et Tatjana Haitina, pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je remercie ensuite les nombreuses personnes avec qui j'ai eu le plaisir d'intéragir ces dernières années, dans des cadres aussi divers que variés, et sans ordre particulier :

Au labo d'abord, un immense merci au “rez-de-chaussée” de l'ISEM, ça aura été un plaisir de vous côtoyer tout au long de ces trois années de thèse. Je remercie particulièrement les personnes suivantes : Suzanne Jiquel pour avoir toléré mon invasion régulière (pour ne pas dire permanente) de l'atelier avec divers spécimens, et pour le squattage toujours plus important des congélateurs. Laurent Marivaux, mon “ex-directeur officiel” pour les aventures sahariennes, entre tamisage, courbine et harissa. Julien Claude, pour sa contribution régulière à mon enrichissement culturel et intellectuel, et bien sur pour les pots de sauce béarnaise avec supplément plathelminthe. Henri Cappetta pour son intérêt dans mon travail de thèse, et pour avoir mis à ma disposition sa vaste collection de chondrichthyens. Lionel Hautier et Mélanie Debiais-Thibaud pour le prêt à titre gracieux de leur évier. Ce qui me conduit bien entendu à remercier Guillaume Guinot, véritablement l'homme de la situation quand celle-ci est critique. Bien joué, du coup je suis prêt à oublier que c'est tes papiers qui ont fait planter ma biblio ! Paul Simion pour son aide avec Lyx, pour m'avoir présenté son chien en porcelaine, et plus largement pour les moments de rigolade. Pierre-Olivier Antointe (2ème round !), pour son dynamisme permanent et ses conseils toujours utiles. PH pour ses bonnes blagues. Je remercie également les utilisateurs de la salle de lavage qui auront régulièrement pu retrouver des têtes de poissons glissées au milieu de leurs fossiles.

A ceux avec qui j'ai partagé l'expérience de la thèse : “Meussieur” Julien Benoit, Léanie Alloing-Seguier, Abdou Mahboubi, Myriam Boivin, Samuel Ginot, Rodolfo Salas-

Gismondi, Paul Saunders, Pascal Milesi, et les autres planqués des étages. Un grand merci à Marie Pages et Myriam pour une super année de monitorat passée tous ensemble.

Aux autres copains/copines avec qui j'aurai passé de chouettes moments ces dernières années, souvent autour d'une bière ou d'un *insérez l'animal de votre choix* pas toujours très frais : Tara, Thibaut, Céline, Jean-Christophe, Guus, Alex et bien sur Camille, qui a bien voulu me supporter pendant l'écriture de ce travail.

Je suis également reconnaissant aux personnes qui m'ont encadré ou aidé sur certains aspects techniques de ce travail : Stéphanie Ventéo pour la coupe de nos nombreux embryons et pour son aide avec les hybridations *in situ*. Chantal Cazevieille, Didier Cot et Véronique Viguier pour les heures passées en leur compagnie sur divers microscopes électroniques. Camille Mari, Emilie Le Goff, Marie-Ka Tilak, Fabienne Justy pour l'aide régulière à la paillasse. A Renaud Lebrun pour nous avoir laissé mettre des poissons dans son CT-Scan. Gilles Cuny, pour son intérêt permanent dans mes recherches, les nombreuses discussions que nous avons pu avoir ensemble et pour son accueil chaleureux à Copenhague.

Je remercie également le personnel du Bâtiment 4, et en particulier Olivier Guirado et Colin Durand pour le coup de patte les jours de TP, les oursinades, la place au congélateur (encore), et plus largement pour tous les chouettes moments passés en votre compagnie. Les "Legsien" de Gif-sur-Yvette, pour leur accueil pendant quelques semaines au cours de ma première année de thèse : Véronique Borday-Birraux, Didier Casane et bien entendu Patrick Laurenti, pour les rigolades viennoises et pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse. Les étudiants que j'ai eu le plaisir de cotoyer pendant ces années de thèse : Marie Buysse, Pierre-Antoine Vernet, Mehdi Taleb, Mélanie Burette, Mathieu Ferrier, Myriam Rahim et Rafael Scherrer.

Ces remerciements ne seraient bien entendu pas complets sans une "spéciale kassdédi" à la bande des gros chevreuils : Thomas Guillerme, Benjamin Ramassamy, Frank Barbière, Morgan Le Ny et Sylvain Monteux. Vous êtes loin, en thèse ou autre, et finalement ça aura certainement été une bonne chose ! En attendant de se croiser à nouveau, histoire de voir qui est le patron !

Enfin, je réserve des remerciements particuliers aux personnes suivantes :

Aux chefs les plus chouettes qu'on puisse avoir : Mélanie et Sylvain. Un immense merci pour votre confiance et parfois votre patience. Ça a été un véritable plaisir d'interagir avec vous, que ce soit sur le plan humain ou sur le plan scientifique, et ces trois années n'auraient pas été une expérience aussi positive et enrichissante sans vous.

Et bien évidemment à ma famille, en particulier Jean-François, Christine, Thérèse, Yvan, Jeanne, Jean-Claude, Andrée et les frangins, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci de m'avoir toujours encouragé dans cette voie.

Table des matières

I. Introduction générale	5
1. Contexte évolutif	6
2. Tissus minéralisés et structures dentaires	8
2.1. Le squelette des vertébrés	8
2.2. Séquence d'acquisition des caractères squelettiques	9
2.3. Structures dentaires	13
3. Le squelette des chondrichthyens	15
4. Les chondrichthyens dans le registre fossile	17
4.1. Brève histoire évolutive	17
4.2. Dentition et histologie dentaire	22
5. Paléontologie et développement	27
6. Problématique et plan	30
II. Matériel et Méthodes	33
7. Matériel	34
7.1. Matériel dentaire fossile et actuel	34
7.2. Matériel biologique	35
8. Méthodes	37
8.1. Microscopie électronique à balayage	37
8.2. Microscopie électronique à transmission	38
8.3. Histologie	38

Table des matières

8.4. Données de séquences d'ADNc de roussette et de raie	39
8.5. Préparation des sondes ARN	40
8.6. Hybridations <i>in situ</i>	41
8.7. Microtomographie à rayons-X	41
8.8. Colorations au bleu alcian et au rouge d'alizarine	42
8.9. Préparations ostéologiques	43
8.10. Manuscrit 1 : « A complete protocol for the preparation of chondrichthyan skeletal specimens »	44
III. Diversité et évolution de la microstructure dentaire des sélaciens	55
9. L'émailloïde des néosélaciens : contexte historique	56
10. Diversité des caractères dentaires microstructuraux des néosélaciens	63
10.1. Néosélaciens	63
10.2. Hybodontes et cténacanthes	66
11. Microstructure des Sclérorhynchiformes	70
11.1. Morphologie	72
11.2. Discussion	76
12. Évaluation des hypothèses adaptatives	78
12.1. Microstructure dentaire des Myliobatiformes	80
12.2. Spécialisations trophiques chez les sélachimorphes	83
13. Intérêt des caractères microstructuraux	85
14. Publications associées	91
14.1. Publication 1 : « Chondrichthyan tooth enameloid : past, present, and future »	91
14.2. Publication 2 : « Simplification of the enameloid microstructure of large stingrays (Chondrichthyes : Myliobatiformes) : a functional approach » . .	114

IV. Développement dentaire chez les néosélaciens	127
15. Développement et composition des tissus dentaires	128
16. Histologie et ultrastructure	132
16.1. Histologie	133
16.2. Ultrastructure	148
16.3. Discussion	150
17. Approche moléculaire : odontogénèse et biominéralisation	158
17.1. Collagènes	161
17.2. Kératines	163
17.3. SPARCs	163
18. Discussion	165
V. Développement et calcification du squelette chez <i>Scyliorhinus canicula</i> : approches morphologique et moléculaire	169
19. Structures squelettiques	170
19.1. Calcification du squelette cartilagineux	170
19.2. Présence potentielle de tissus osseux	172
19.3. Problématique	172
20. Aspects morphologiques de la squelettogénèse	174
20.1. Dynamique de minéralisation du squelette axial et du squelette dermique	175
20.1.1. Dentition	175
20.1.2. Denticules dermiques	177
20.1.3. Squelette axial	180
20.1.4. Autres structures notables	180
20.2. Mise en place du squelette appendiculaire	181
20.2.1. Morphologie adulte	182
20.2.2. Nageoires pectorales	183
20.2.3. Nageoires pelviennes	186

Table des matières

21. Approche moléculaire de la squelettogénèse au cours du développement embryonnaire	191
21.1. Identité moléculaire des sites de calcification	192
21.1.1. Calcification et données d'expression des collagènes de type I et II	193
21.1.2. Données d'expression des collagènes de type XI et des SPARCs . .	195
21.2. Discussion	195
21.2.1. Séquence de minéralisation du squelette de <i>S. canicula</i>	198
21.2.2. Contexte moléculaire de la calcification des pièces squelettiques . .	200
21.2.3. Evolution des tissus osseux	201
22. Publications associées	204
22.1. Manuscrit 2 : « Skeletogenesis during the late development of the catshark <i>Scyliorhinus canicula</i> (Chondrichthyes; Neoselachii) »	204
22.2. Publication 3 : « Molecular footprinting of skeletal tissues in the catshark <i>Scyliorhinus canicula</i> and the clawed frog <i>Xenopus tropicalis</i> identifies conserved and derived features of vertebrate calcification »	216
VI. Conclusion et perspectives	232
23. Données paléontologiques et développementales	233
23.1. Chondrichthyens non-néosélaciens	235
23.2. L'émailloïde chez les actinoptérygiens	237
24. Diversité du squelette des chondrichthyens	241
Bibliographie	248

Première partie .

Introduction générale

1. Contexte évolutif

L'apparition des gnathostomes, remontant probablement à l'Ordovicien supérieur (environ 450 Ma) (Sansom et al., 1996, 2001; Turner et al., 2004), et leur remarquable diversification constitue un des événements majeurs de l'évolution du vivant. Ils représentent aujourd'hui plus de 99% de la diversité des vertébrés (Brazeau & Friedman, 2015), qui résulte de la divergence de deux clades principaux : les ostéichthyens (poissons osseux), qui regroupent les actinoptérygiens et sarcoptérygiens, et les chondrichthyens (poissons cartilagineux) regroupant raies, requins et chimères. La divergence entre ces deux groupes est estimée entre 460 Ma et 420 Ma et leur monophylie respective est supportée aussi bien par les analyses morphologiques que par des données moléculaires (Benton et al., 2009; Brazeau & Friedman, 2014; Chen et al., 2012; Hedges, 2001).

L'histoire évolutive des gnathostomes est également marquée par la diversification de plusieurs groupes aujourd'hui éteints, et dont les affinités évolutives sont beaucoup moins bien connues. Parmi ces groupes on trouve notamment un assemblage de taxons paraphylétiques couramment appelés « ostracodermes » (figure 2.2), mais également les premiers vertébrés possédant une mâchoire articulée : les placodermes et les acanthodiens (Brazeau & Friedman, 2015; Donoghue & Sansom, 2002). Les placodermes sont un groupe paraphylétique de poissons cuirassés bien diversifiés au Paléozoïque, caractérisés par un squelette dermique important formant un bouclier céphalique articulé, tandis que les acanthodiens sont des poissons de petite taille dont le corps était recouvert d'écailles et de nombreuses épines dermiques (Janvier, 1996; Young, 2010).

Les affinités phylogénétiques de ces groupes ont longtemps été débattues, et ils sont toujours étudiés pour tenter de comprendre l'origine de la diversité des gnathostomes actuels. Les acanthodiens ont constitué un problème particulièrement épineux car ils présentent une mosaïque de caractères morpho-anatomiques présents à la fois chez les ostéichthyens et chez les chondrichthyens. Ainsi ils ont successivement été considérés

1. Contexte évolutif

comme un groupe monophylétique proche des ostéichthyens, puis comme un groupe paraphylétique et distribué à la base des chondrichthyens et des ostéichthyens avant que la découverte d'un placoderme présentant une combinaison de caractères unique, *Enthelognathus primordialis*, par Zhu et al. (2013) dans le Silurien de Chine, n'en fasse un groupe paraphylétique qui enracine les chondrichthyens (Brazeau, 2009; Davis et al., 2012; Friedman & Brazeau, 2013). Ce placement, soutenu par tous les travaux récents (Dupret et al., 2014; Giles et al., 2015), aura certainement des conséquences majeures dans notre perception de l'histoire évolutive des groupes actuels, et en particulier de celle des chondrichthyens, longtemps injustement considérés comme la branche « primitive » des gnathostomes. Ils sont en effet dépourvus de squelette interne ossifié, qui constitue pourtant l'une des caractéristiques anatomiques les plus marquantes des vertébrés actuels.

2. Tissus minéralisés et structures dentaires

2.1. Le squelette des vertébrés

Classiquement défini comme l'ensemble des parties minéralisées du corps des vertébrés, le squelette assure un support mécanique à l'organisme, permet les attaches musculaires et fournit une protection aux organes internes. Il est également impliqué dans plusieurs processus physiologiques (stockage d'ions, hématopoïèse...) (Francillon-Vieillot et al., 1990; Lingham-Soliar, 2014). Son constituant principal, l'os, résulte de la calcification d'une matrice organique principalement composée de collagène via le dépôt d'hydroxyapatite, une forme de phosphate de calcium. Mais si la notion de squelette évoque immédiatement l'os, ce n'est toutefois pas son unique constituant. Le squelette des vertébrés est également caractérisé par trois autres grands types de tissus minéralisés : le cartilage (pouvant se calcifier), la dentine et l'émail (Hall, 2005). Il existe aussi des tissus parfois qualifiés d'« intermédiaires » et dont les relations d'homologie et l'origine embryonnaire ne sont pas toujours bien comprises, tels que l'émailloïde, l'acrodine, la ganoïne, le ciment ou l'os chondroïde pour en citer quelques-uns (Francillon-Vieillot et al., 1990; Hall, 2005; Huysseune & Sire, 1990). Ces tissus présentent des degrés de minéralisation variables, et constituent un véritable continuum morphologique de tissu minéralisés, dont les limites ne sont pas toujours bien établies.

Le squelette d'un vertébré est composé de deux systèmes distincts (e.g. Francillon-Vieillot et al., 1990) : le squelette interne et le squelette dermique. Cette dichotomie fondamentale, connue depuis le 19^{ème} siècle (Arendt, 1822), a été largement étudiée depuis d'un point de vue morphologique, développemental et évolutif. Le squelette interne, constitué par la plus grande partie du squelette axial, appendiculaire et par une partie du squelette crânien, dérive du mésenchyme embryonnaire (mésoderme). Il se développe à partir d'un précurseur cartilagineux dont la matrice est ossifiée au cours du développement chez

2. Tissus minéralisés et structures dentaires

la plupart des vertébrés (Francillon-Vieillot et al., 1990). Le processus d'ossification se produit au sein même du précurseur cartilagineux (ossification endochondrale), mais également à sa surface (ossification périchondrale) via la calcification du périchondre, membrane entourant les pièces cartilagineuses (Hall, 2005). La structure du squelette interne repose donc sur les tissus cartilagineux, qui sont ensuite ossifiés chez certains groupes. Le squelette dermique se développe en revanche de manière beaucoup plus superficielle, directement au sein du derme, en l'absence de précurseur cartilagineux, et à partir de mésenchyme issu au moins en partie de cellules de la crête neurale (Hirasawa & Kuratani, 2015). Il inclut entre autre, une partie du squelette craniofacial, mais également les ostéodermes, les rayons des nageoires, des tissus dentaires ainsi que certains types d'écailles. Il est donc représenté par plusieurs catégories de tissus qui incluent cartilage, os, dentine et plusieurs formes de tissus hyperminéralisés.

Certains éléments de l'endosquelette possèdent toutefois une origine dermique (le dentaire ou la clavicule des mammifères par exemple (Crompton & Parkyn, 1963; Romer, 1924), et inversement, des os du squelette interne ont migré en périphérie du corps au cours de l'évolution de certains groupes, comme les os de la carapace des tortues (Hirasawa et al., 2013). Certaines pièces osseuses résultent également de la fusion d'os d'origine dermique et enchondrale, ce qui illustre bien la difficulté de proposer une définition stable à ces systèmes squelettiques en combinant les critères structurels, topologiques et embryonnaires.

2.2. Séquence d'acquisition des caractères squelettiques

L'origine du squelette chez les vertébrés est une question fondamentale en biologie évolutive. Son potentiel de fossilisation donne un accès direct aux changements évolutifs s'étant produits au cours du temps géologique. Cette perspective temporelle permet notamment de reconstruire la séquence d'acquisition des caractères squelettiques dans l'histoire des vertébrés (figure 1). L'accès à des techniques d'imagerie de pointe et la découverte de nouveaux fossiles à suscité un regain d'intérêt considérable dans cet aspect de l'évolution des vertébrés au cours de ces dernières années. Des travaux récents, couplés à une meilleure compréhension des relations phylogénétiques au sein des premiers gnathostomes ont ainsi permis de préciser la séquence d'acquisition de certains

2. Tissus minéralisés et structures dentaires

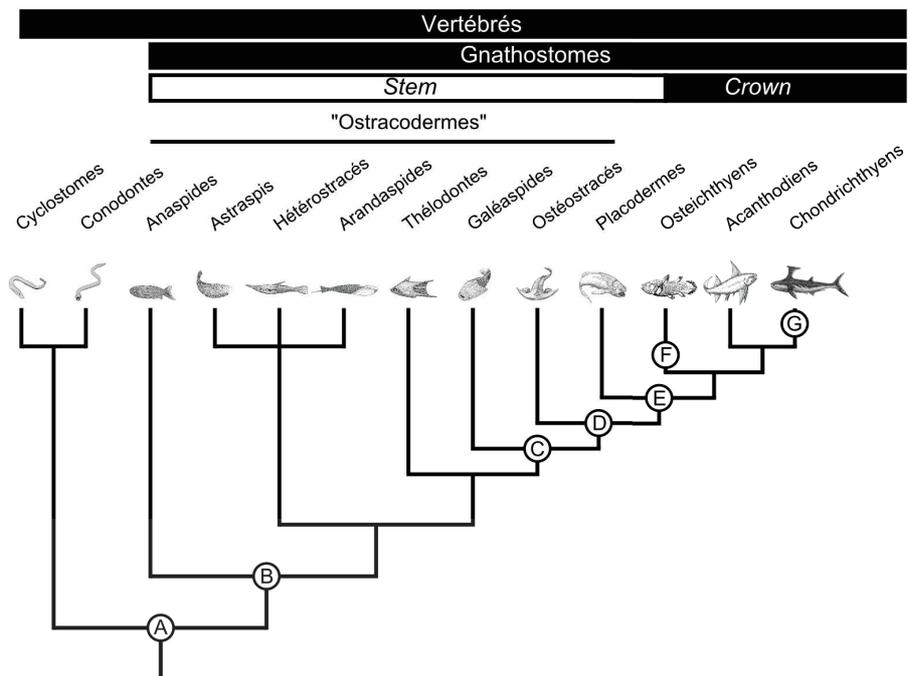


FIGURE 1. – Phylogénie des vertébrés, modifiée d'après Donoghue et al., 2006; Janvier, 2015; Keating et al., 2015. **A** : origine d'un squelette cartilagineux non minéralisé ; **B** : origine d'un squelette dermique calcifié et des autres grands types de tissus minéralisés : os, dentine, émailloïde ; **C** : neurocrâne minéralisé ; **D** : apparition de l'os péri-chondral ; **E** : apparition des mâchoires, minéralisation du splanchnocrâne et dents en association avec les mâchoires ; **F** : apparition de l'os endochondral ; **G** : perte secondaire de l'ossification péri-chondrale chez les chondrichthyens.

2. Tissus minéralisés et structures dentaires

caractères fondamentaux du squelette des vertébrés actuels (figure 1) (Donoghue, 2002; Donoghue et al., 2006; Donoghue & Keating, 2014; Janvier, 2015; Sire et al., 2009).

L'origine du squelette est antérieure à la divergence des deux grands groupes de vertébrés, les cyclostomes et les gnathostomes. Les cyclostomes, un groupe actuellement peu diversifié, composé des lamproies et des myxines, possèdent en effet un squelette rudimentaire incluant un crâne, des arcs branchiaux et des cartilages vertébraux rudimentaires. On peut donc supposer que de telles structures étaient déjà présentes chez le dernier ancêtre commun des vertébrés, mais ces éléments ne sont jamais calcifiés (Janvier, 2011; Ota et al., 2011). Cependant, *Euphanerops*, un taxon aux affinités incertaines du Dévonien supérieur (380 Ma) présente des caractères squelettiques similaires aux cyclostomes, mais dont les cartilages sont calcifiés chez les formes adultes (Janvier & Arsenault, 2007; Janvier, 2015). Sa position phylogénétique est mal résolue : il est considéré alternativement comme appartenant aux cyclostomes ou bien aux ostracodermes, ce qui pourrait indiquer un processus de minéralisation des pièces squelettiques indépendant de ces derniers (Donoghue et al., 2006; Gess et al., 2006; Janvier & Arsenault, 2002).

Les conodontes constituent un autre groupe dont la position phylogénétique est longtemps restée incertaine. Le terme de conodonte désigne en réalité des pièces minéralisées très abondantes au Paléozoïque et pouvant présenter une morphologie assez variable. Des fossiles complets de ces animaux présentent un assemblage complexe d'éléments conodontes situés au niveau de la cavité buccale, et une morphologie congruente avec celle des premiers vertébrés (Aldridge et al., 1993; Briggs et al., 1983; Purnell, 1995). De ce fait, ils ont été considérés par certains auteurs comme les premiers organismes présentant des structures dentaires minéralisées au sein des vertébrés (Donoghue & Sansom, 2002; Sanson et al., 1992). Ces éléments ne sont cependant pas homologues avec les structures dentaires des vertébrés, une question qui a toutefois été longuement débattue (Donoghue & Aldridge, 2000; Murdock et al., 2013; Turner et al., 2010). Considérant les caractères morpho-anatomiques de ces animaux, il apparaît donc plus probable qu'ils constituent le groupe frère des cyclostomes ou qu'ils se situent à la base des vertébrés (Donoghue et al., 2000; Goudemand et al., 2011; Janvier, 2015), bien que d'autres auteurs envisagent également que les conodontes ne soient pas des vertébrés (Turner et al., 2010).

Si l'apparition d'un squelette cartilagineux est antérieure à la divergence des cyclostomes et des gnathostomes, les premières traces d'un squelette minéralisé sont à chercher chez

2. Tissus minéralisés et structures dentaires

les ostracodermes, série de grades évolutifs florissant entre l'Ordovicien et le Dévonien (entre 485 et 358 Ma) (Donoghue & Sansom, 2002; Donoghue et al., 2006). Ces groupes, distribués à la base des gnathostomes, sont dépourvus de mâchoire mais possèdent un squelette dermique minéralisé et plus ou moins étendu selon les groupes (Donoghue, 2002; Janvier, 1996; Keating et al., 2015). La structure de base de ce squelette dermique est caractérisée par des tubercules de dentine, éventuellement recouverts par de l'émailloïde, un tissu hyperminéralisé (*sensu* Sire et al., 2009) reposant sur une base osseuse. En fonction des groupes, ce squelette présente cependant différentes combinaisons de tissus squelettiques, dont certains n'existent plus chez les gnathostomes actuels tels que l'aspidine, l'isopédine ou la lamelline (Janvier, 2015; Keating et al., 2015; Sire et al., 2009). Si la nature précise de ces tissus n'est d'ailleurs pas toujours bien établie, l'histologie de leur squelette dermique a toutefois été largement utilisée afin de tenter de résoudre leurs relations évolutives (Karatayute-Talimaa, 1998; Sire et al., 2009).

Les premières traces d'ossification périchondrale sont documentées chez les ostéostracés dont certains possèdent également une endosquelette partiellement minéralisé, celui-ci étant limité au crâne et à des éléments de la ceinture scapulaire (Donoghue & Sansom, 2002). Le splanchnocrâne est ensuite minéralisé chez les placodermes, les ostéichthyens, les acanthodiens et les chondrichthyens, et associé à des structures dentaires (Donoghue & Rücklin, 2014; Rücklin et al., 2012; Keating et al., 2015). L'ossification endochondrale est finalement le dernier type d'ossification à évoluer chez les vertébrés, et celui-ci est unique aux ostéichthyens (Donoghue & Sansom, 2002).

L'apparition séquentielle de ces caractères squelettiques au cours de l'évolution des vertébrés permet finalement de dégager quelques points importants : i) un squelette cartilagineux non minéralisé existait probablement chez le dernier ancêtre commun des vertébrés. Ce squelette a ensuite été minéralisé au cours de l'évolution des gnathostomes ; ii) les ostracodermes présentent un squelette dermique dont l'étendue et la composition sont variables ce qui indique que la calcification du squelette dermique a précédé celle du squelette interne au cours de l'évolution des vertébrés ; iii) la diversité de tissus minéralisés composant leur squelette révèle que les tissus dentaires classiques (dentine et émailloïde) ont évolué avant l'apparition des structures dentaires et en association avec des os dermiques ; iv) certains types de tissus squelettiques peuvent être perdus secondairement au cours de l'histoire évolutive d'un groupe, ce qui est bien illustré par la

perte de l'ossification péricondrale chez les chondrichthyens actuels.

2.3. Structures dentaires

L'acquisition des dents au cours de l'évolution des gnathostomes est souvent considérée, au même titre que celle des mâchoires, comme un des évènements majeurs à l'origine de leur succès évolutif (Donoghue & Rücklin, 2014). La dentition des vertébrés est ainsi caractérisée par une grande diversité de formes et de fonctions. La position des dents, à l'interface entre l'organisme et son alimentation, en fait également des structures potentiellement informatives dans un contexte à la fois phylogénétique et adaptatif. Les structures dentaires et les éléments du squelette dermique des premiers vertébrés partagent souvent la même organisation de base : un cône de dentine englobant une cavité pulpaire, éventuellement recouvert par un tissu hyperminéralisé et reposant sur une base osseuse (ou constituée par un autre tissu minéralisé) (Witten et al., 2014; Zangerl et al., 1993). Cette structure de base, d'abord rencontrée au sein du squelette dermique est qualifiée d'odontode (Huyseune & Sire, 1998; Reif, 1982). Ces structures peuvent constituer des unités isolées, comme les denticules dermiques des chondrichthyens, ou bien fusionner pour former des « odontocomplexes » (Huyseune & Sire, 1998; Sire et al., 2009). Bien que les dents et les denticules dermiques soient parfois regroupés sous le terme plus global de structures odontoïdes, Reif (2006) fait toutefois la distinction entre les deux : la structuration et le renouvellement de la dentition découlent du développement des dents au sein d'une lame dentaire, absente des odontodes en formation.

Le développement des dents et des odontodes est toutefois un processus très conservé d'un point de vue développemental, et il est bien établi que ces structures résultent d'une interaction entre un épithélium et du mésenchyme incluant des cellules de la crête neurale, qui donneront respectivement les améloblastes et les odontoblastes (Debiais-Thibaud et al., 2011; Sharpe, 2001). Les débats entourant l'histoire évolutive de ces structures sont illustrés par deux hypothèses appelées respectivement « *outside in* » et « *inside out* ». La première propose que les dents orales et pharyngiennes dérivent d'odontodes (Blais et al., 2011; Reif, 1982; Smith & Hall, 1990), tandis que le scénario inverse (« *inside out* ») suggère que ces structures soient d'abord apparues dans la cavité oropharyngée et implique notamment l'évolution répétées de structures dentaires au sein

2. Tissus minéralisés et structures dentaires

des gnathostomes (Johanson & Smith, 2003; Smith & Coates, 1998; Smith & Johanson, 2003). Cette hypothèse se base sur plusieurs arguments paléontologiques (interprétation des éléments conodontes comme des structures dentaires) et développementaux (origine ectodermique des odontodes et origine endodermique des dents) ayant été réfutés par la suite (Murdock et al., 2013; Huysseune et al., 2009; Ohazama et al., 2010; Tucker & Sharpe, 2004). L'hypothèse « *outside in* » est en revanche bien soutenue par des données paléontologiques, histologiques et développementales (Witten et al., 2014). Dans ce contexte, les dents et les denticules dermiques des chondrichthyens, qui seront largement abordés au cours de ce travail, sont considérés non seulement comme des structures homologues d'un point de vue développemental (homologie sérielle (Debiais-Thibaud et al., 2011), c'est à dire résultat de la même cascade de régulation génétique, mais également homologues d'un point de vue évolutif. Bien que le développement des denticules dermiques ne soit pas associé à une lame dentaire, le rôle de celle-ci est ici considéré comme limité au développement spatio-temporel de ces structures et ne doit pas impacter leur minéralisation ou leur structure interne.

3. Le squelette des chondrichthyens

La rétention d'un squelette cartilagineux (qui peut cependant être fortement calcifié (Dean & Summers, 2006; Hall, 2005)) a conduit de nombreux auteurs à considérer les chondrichthyens comme primitifs (si le cartilage précède l'os au cours du développement embryonnaire, considérer que c'est également le cas au cours de l'évolution peut sembler assez intuitif, il s'agit cependant de récapitulation). Cette interprétation a conduit à utiliser des caractères spécifiques des chondrichthyens pour reconstruire le morphotype classique du « gnathostome ancestral ». Cette conception est à la fois issue de travaux classiques d'anatomie comparée (e.g. Goodrich, 1930), mais aussi de l'étude plus récente de taxons fossiles aux affinités phylogénétiques mal définies (e.g. Brazeau, 2009; Davis et al., 2012).

Avec l'accès à de nouvelles techniques d'imagerie et d'analyse (microtomographie à rayons X, synchrotron...), la réinterprétation du registre fossile, et la découverte de nouveaux fossiles bien préservés, des travaux récents ont permis de mettre en évidence les caractéristiques très « ostéichthyennes » du squelette dermique, branchial et crânien de taxons positionnés à la base des chondrichthyens et des ostéichthyens ou même des gnathostomes (Maisey & Anderson, 2001; Maisey et al., 2009; Pradel et al., 2014; Zhu et al., 2013). Ces données ont ainsi permis de considérer de nombreux caractères typiquement chondrichthyens sous un jour nouveau. Les travaux de ces dernières années sont donc en train d'inverser le paradigme initial, et de fournir un nouveau cadre théorique et phylogénétique à l'étude des premiers gnathostomes, reconnaissant au passage les caractéristiques dérivées des chondrichthyens actuels (Brazeau & Friedman, 2015; Friedman & Brazeau, 2013).

Dans ce contexte il peut cependant être intéressant de distinguer le squelette dermique (dents orales et denticules dermiques) du squelette interne. En effet, s'il semble maintenant bien établi que le squelette interne des chondrichthyens est dérivé secondairement,

3. Le squelette des chondrichthyens

les tissus constituant les structures dentaires (émailloïde et dentine) possèdent une longue histoire évolutive et une répartition importante dans l'arbre des gnathostomes. On les retrouve en effet fréquemment chez les premiers vertébrés, chez qui ils sont des composantes importantes du squelette dermique. Longtemps cantonnée à la paléohistologie, l'étude de ces structures peut maintenant bénéficier des apports de la génétique du développement, pouvant potentiellement clarifier l'identité, l'évolution et les relations d'homologies de ces tissus (Qu et al., 2015).

Pour des raisons d'ordre pratique, les disciplines associées à des approches développementales se basent souvent sur l'étude d'organismes modèles, espèces animales ou végétales dont l'étude poussée de mécanismes biologiques variés doit permettre l'extrapolation de ces observations à d'autres groupes biologiques moins connus (Fields & Johnson, 2005). Au sein des vertébrés, les organismes modèles « classiques » appartiennent pour la plupart au groupe des tétrapodes avec la souris (*Mus musculus*), le poulet (*Gallus gallus*) et le xénope (*Xenopus laevis*), bien que l'utilisation du poisson-zèbre (*Danio rerio*), ait permis d'élargir le champ d'étude aux ostéichthyens au cours des dernières années (Jenner & Wills, 2007). L'homme peut également être ajouté à cette liste considérant la quantité considérable de données générées par la recherche biomédicale. L'étude des chondrichthyens dans un contexte évolutif est donc parfaitement justifiée : leur position phylogénétique clé dans l'arbre des gnathostomes actuels doit permettre d'effectuer des comparaisons à large échelle taxonomique avec les modèles ostéichthyens et donc de pouvoir discuter d'évènements évolutifs ayant eu lieu à l'échelle des gnathostomes. Cette approche comparative est également nécessaire afin de pouvoir établir des relations d'homologie entre des structures anatomiques et/ou génomiques, polariser les caractères considérés et inférer leur état ancestral dans un cadre phylogénétique.

4. Les chondrichthyens dans le registre fossile

4.1. Brève histoire évolutive

Les chondrichthyens (figure 2) sont documentés avec certitude depuis le Dévonien inférieur (Cappetta et al., 1993; Derycke et al., 1995), et sont constitués de deux grandes groupes : les euchondrocéphales et les élasmobranches. Ils sont caractérisés par la possession de ptérygopodes (ou myxopterigium), organes copulateurs mâles dérivés de la nageoire pelvienne et par la possession de cartilage prismatique calcifié. Les euchondrocéphales regroupent les holocéphales, groupe auquel appartiennent les chimères actuelles (figure 2-G,J), et plusieurs taxons encore assez énigmatiques sur la base de caractères morpho-anatomiques tels que l'articulation de la mâchoire (palatocarré fusionné au neurocrâne) et la perte des denticules dermiques (Didier et al., 1998, 2012; Janvier, 1996). Les euchondrocéphales sont particulièrement diversifiés au Paléozoïque et notamment au Carbonifère, mais le groupe est très impacté par la crise permo-triassique, et seuls les holocéphales vont se diversifier par la suite (Grogan & Lund, 2004).

Les élasmobranches regroupent les néosélaciens (ou sélaciens), groupe monophylétique constitué des raies et des requins « modernes » (figure 2-A-F, H, I, K) et par un certain nombre de taxons fossiles regroupés en divers grades évolutifs. Ces derniers incluent entre autres les xénacanthes, au corps fusiforme et possédant une dorsale unique ; les cténacanthes, possédant des épines dorsales importantes, et les hybodontes, le groupe frère des néosélaciens, bien diversifiés au secondaire avant leur extinction à la fin du Crétacé (Coates & Gess, 2007; Ginter et al., 2010; Janvier, 1996; Maisey et al., 2004; Zangerl, 1981). Ces taxons fossiles occupaient déjà les mêmes niches écologiques que les espèces actuelles, y compris les milieux dulcicoles (Cuny et al., 2004; Zangerl, 1981),

4. Les chondrichthyens dans le registre fossile

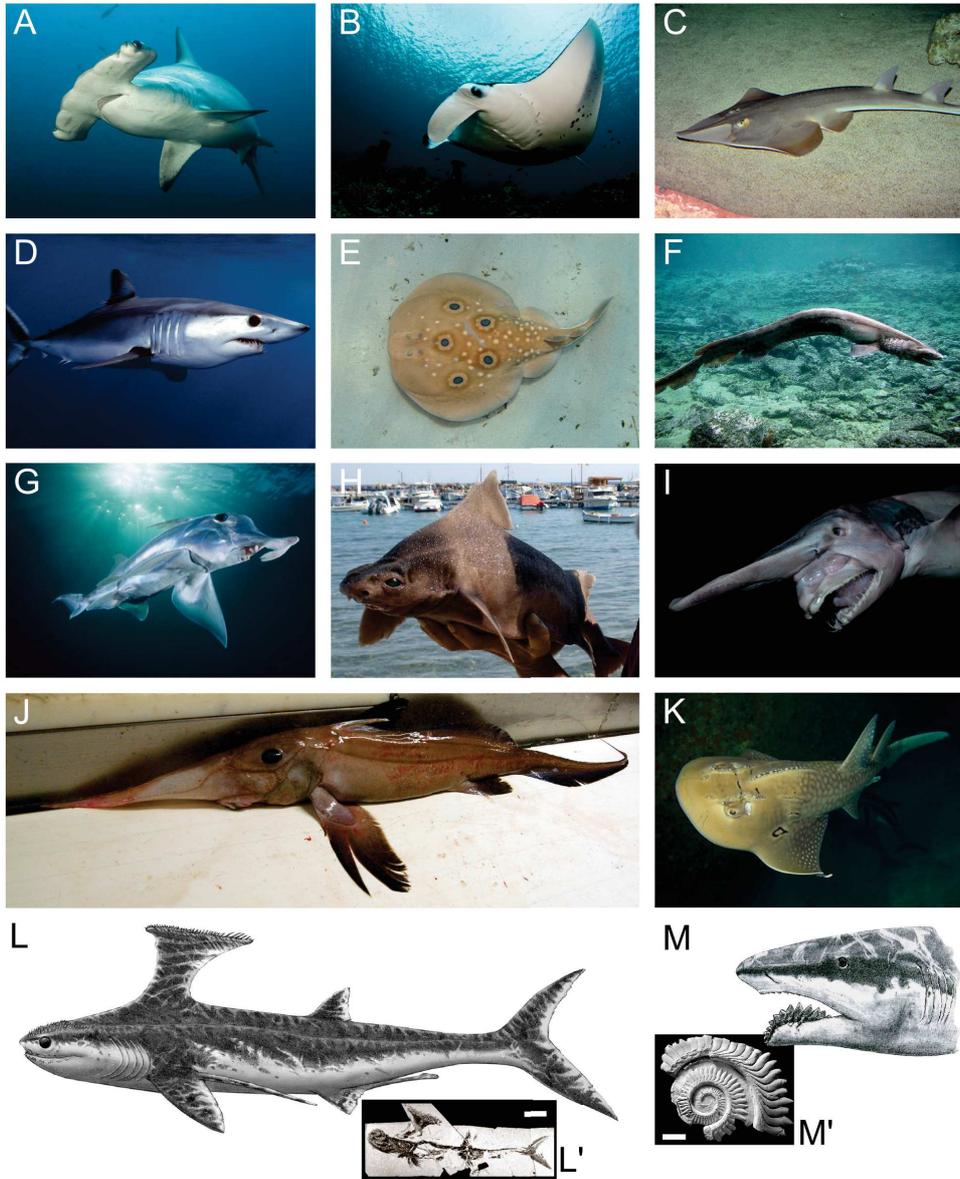


FIGURE 2. – Diversité morphologique des chondrichthyens : **A** : *Sphyrna lewini* (S. Rogerson), **B** : *Manta alfredi* (S. ElkCloner), **C** : *Rhinobatos rhinobatos* (J. Fredriksson), **D** : *Isurus oxyrinchus* (J. Stafford-Deitsch), **E** : *Torpedo torpedo* (R. Pillon), **F** : *Chlamydoselachus anguineus* (Awashima Marine Park), **G** : *Callorhinchus milii* (K. Aitken), **H** : *Oxynotus centrina* (J. Franke), **I** : *Mitsukurina owstoni* (J. Finn), **J** : *Rhinochimaera atlantica* (G. Nordoy), **K** : *Rhina ancylostoma* (R. Merritt), **L** : Reconstruction d'*Akmonistion zangerli* (A. Bénéteau), **L'** : *A. zangerli* (Coates & Sequeira, 2001). Échelle : 5 cm. **M** : Reconstruction de *Sarcoprion edax* (A. Bénéteau), **M'** : « scie dentaire » d'*Helicoprion bessonowi*, un autre Eugeneodontiformes (Lebedev, 2009). Échelle : 2 cm.

4. Les chondrichthyens dans le registre fossile

et les néosélaciens n'occupent pas une place prédominante dans les écosystèmes marins avant le Jurassique (Underwood, 2006).

Les chondrichthyens fossiles sont caractérisés par une disparité morphologique plus importante que les chondrichthyens actuels, et présentent de nombreuses structures anatomiques énigmatiques telles que les « peignes dorsaux » de certains Symmoriiformes (figure 2-L, L') ou les spirales dentaires symphysaires (« scies dentaires ») des Euge-neodontiformes (figure 2-M, M'). Cette diversité morphologique ainsi que des variations importantes de divers caractères morpho-anatomiques rend parfois leur classification problématique et leurs relations phylogénétiques (figure 3-A) sont encore très débattues (e.g. Coates & Sequeira, 2001; Grogan & Lund, 2004; Pradel et al., 2011). Cependant, l'utilisation de techniques comme la microtomographie à rayons-X apporte depuis peu de nouveaux éléments de réponse à ces questions en permettant l'accès à la morphologie et à l'anatomie de fossiles bien préservés (Pradel et al., 2011, 2014).

La divergence entre les euchondrocéphales et les élasmobranches est estimée entre 420 et 410 Ma, les données moléculaires et paléontologiques étant remarquablement concordantes sur ce point (Coates & Sequeira, 2001; Inoue et al., 2010), bien que les estimations basées sur des données moléculaires aillent jusqu'à 170 Ma (Heinicke et al., 2009). Les holocéphales présentent une faible diversité spécifique à l'heure actuelle : environ 47 espèces évoluant préférentiellement en eaux profondes (Didier, 1995; Didier et al., 2012). Les adultes sont complètement dépourvus de denticules dermiques et leurs arcs branchiaux sont concentrés sous le neurocrâne, protégés par un opercule charnu (Dean, 1906; Didier et al., 2012; Gillis et al., 2011). Les chimères sont également caractérisées par une dentition unique, composée de trois paires de plaques dentaires (une paire mandibulaire et deux paires sur le palatocarré (figure 5-F)) à croissance continue, et par un aiguillon dorsal de taille importante (Didier, 1995).

Les néosélaciens, dont l'origine remonte au Permien (Ginter et al., 2010; Ivanov, 2005; Klug, 2010) sont les chondrichthyens les plus diversifiés aujourd'hui (plus de 1100 espèces), et présentent un large éventail de spécialisations trophiques et de traits d'histoire de vie (Compagno, 1990; Maisey et al., 2004). Ils sont notamment caractérisés par des fentes branchiales apparentes (entre 5 et 7), un cartilage palatocarré non fusionné au neurocrâne et articulé de différentes façons à celui-ci (Maisey, 1980) et une dentition polyphiodonte (renouvellement dentaire continu), dont les dents sont formées profondé-

4. Les chondrichthyens dans le registre fossile

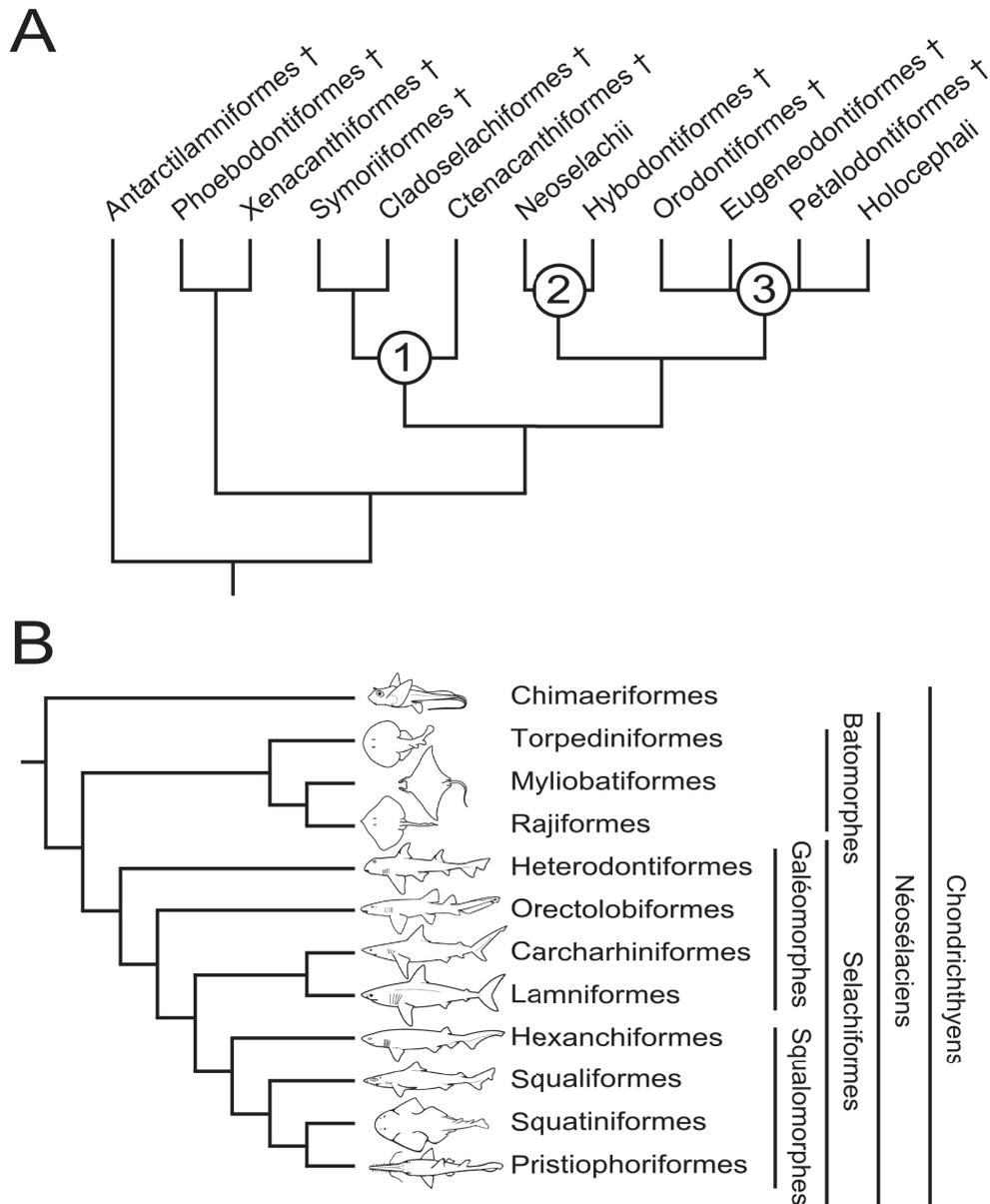


FIGURE 3. – Phylogénie des chondrichthyens. **A** : cladogramme des chondrichthyens actuels et fossiles, modifié d'après Ginter et al., 2010. 1 : Cladodontomorphes, 2 : Eusélaciens, 3 : Euchondrocéphales. Pour les hypothèses alternatives concernant les relations au sein des groupes paléozoïques, voir Pradel et al. (2011). **B** : cladogramme illustrant une hypothèse des relations entre les ordres de chondrichthyens actuels, modifié d'après Douady et al. (2003); McEachran & Aschliman (2004). D'autres topologies existent (e.g. Guinot et al., 2012; Maisey et al., 2004).

4. Les chondrichthyens dans le registre fossile

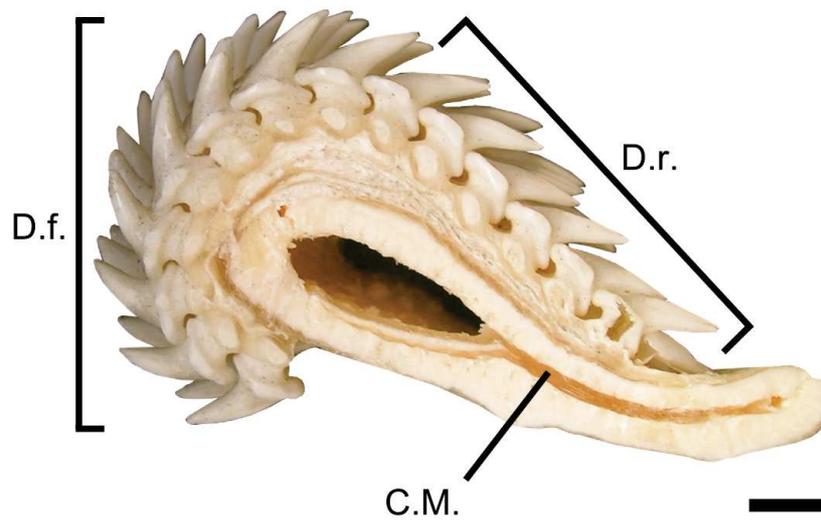


FIGURE 4. – Coupe transversale de mâchoire de *Raja clavata*. Échelle : 7,5 cm

ment dans la lame dentaire et organisées en familles dentaires (figure 4). Le corps de la plupart des néosélaciens est recouvert par un squelette dermique important constitué par des denticules de morphologie variable, qui tendent cependant à être réduit voire à disparaître chez certaines raies (Claeson et al., 2013).

La monophylie respective des holocéphales et des néosélaciens est soutenue à la fois par des caractères moléculaires et morphologiques (Arnason et al., 2001; de Carvalho, 1996; Douady et al., 2003; Winchell et al., 2004; Naylor et al., 2005; Shirai, 1996). Si les relations entre ces deux groupes sont bien résolues, l'organisation systématique des néosélaciens (figure 3-B) est en revanche plus problématique, et plusieurs hypothèses phylogénétiques existent dans la littérature concernant les relations des deux grands groupes de requins (sélachimorphes) : les galéomorphes et les squalomorphes, ainsi que la position des raies (batomorphes ou batoïdes). Les relations phylogénétiques de ces dernières, connues depuis le Jurassique, ont en effet longtemps été controversées (Capetta, 2012; Delsate & Candoni, 2001; Maisey et al., 2004; Underwood, 2006). Si les premiers travaux basés sur des caractères morphologiques (e.g. Regan, 1906; Holmgren, 1940) les considèrent déjà comme le groupe frère des sélachimorphes (requins), une hypothèse persistante (« hypnosqualéens ») en fait un groupe de squalomorphes très dérivé, avec une morphologie associée à un mode de vie principalement benthique et associé aux pristiophoridés et aux squatinidés (de Carvalho, 1996; Shirai, 1996). Cette hypothèse

4. Les chondrichthyens dans le registre fossile

a finalement été réfutée par les premières phylogénies moléculaires, qui ont permis de démontrer la monophylie respective des sélachimorphes et des batomorphes (Aschliman et al., 2012; Douady et al., 2003; Maisey et al., 2004). Leurs origines évolutives restent cependant obscures dans la mesure où les raies apparaissent dans le registre fossile près de 100 millions d'années après les premiers néosélaciens connus (Cappetta, 2012; Underwood, 2006). Quelques taxons aux affinités incertaines, tels que *Pseudodalatias* (Trias), *Vallisia* (Trias), *Doratodus* (Trias) ou encore *Cooleyella* (Carbonifère) pourraient représenter les premières raies connues (Cuny et al., 2009), et il semble clair que les premiers batomorphes sont indifférenciables des sélachimorphes sur la base de la morphologie dentaire seule. La morphologie caractéristique des dents des raies ne semble donc pas acquise avant le Jurassique.

Le registre fossile des néosélaciens suggère l'existence de plusieurs pics de diversification au cours du secondaire, avant que la crise K/T n'entraîne l'extinction de nombreuses familles (Cappetta, 1987; Guinot et al., 2012; Kriwet et al., 2009; Underwood, 2006). Cette crise affecte les néosélaciens de manière non sélective (tous les types de niches écologiques, types dentaires adaptatifs, etc. sont touchés) et le taux d'extinction subi par le groupe reste modéré (Cappetta, 1987; Guinot et al., 2012). Les assemblages modernes de néosélaciens se mettent ensuite en place au cours du Paléogène, et plusieurs groupes sont caractérisés par une radiation adaptative spectaculaire à partir de l'Éocène, tels que les carcharhinidés et certains Myliobatiformes (Adnet et al., 2012; Cappetta, 1987; Guinot & Cavin, 2015). On peut donc considérer que si le Paléozoïque est l'âge des chimères, le Mésozoïque et le Cénozoïque apparaissent clairement comme l'âge des requins et des raies respectivement, ces dernières étant le clade de chondrichthyens le plus diversifié à l'heure actuelle.

4.2. Dentition et histologie dentaire

Les chondrichthyens présentent un registre fossile abondant, mais incomplet (Guinot et al., 2012; Underwood, 2006), ce qui est en partie dû à leur squelette cartilagineux qui se préserve mal à l'état fossile. Bien que des fossiles complets soient issus de plusieurs gisements fossilifères, ils demeurent exceptionnellement rares et la grande majorité de leur registre fossile est constitué par des denticules dermiques et surtout des dents orales

4. Les chondrichthyens dans le registre fossile

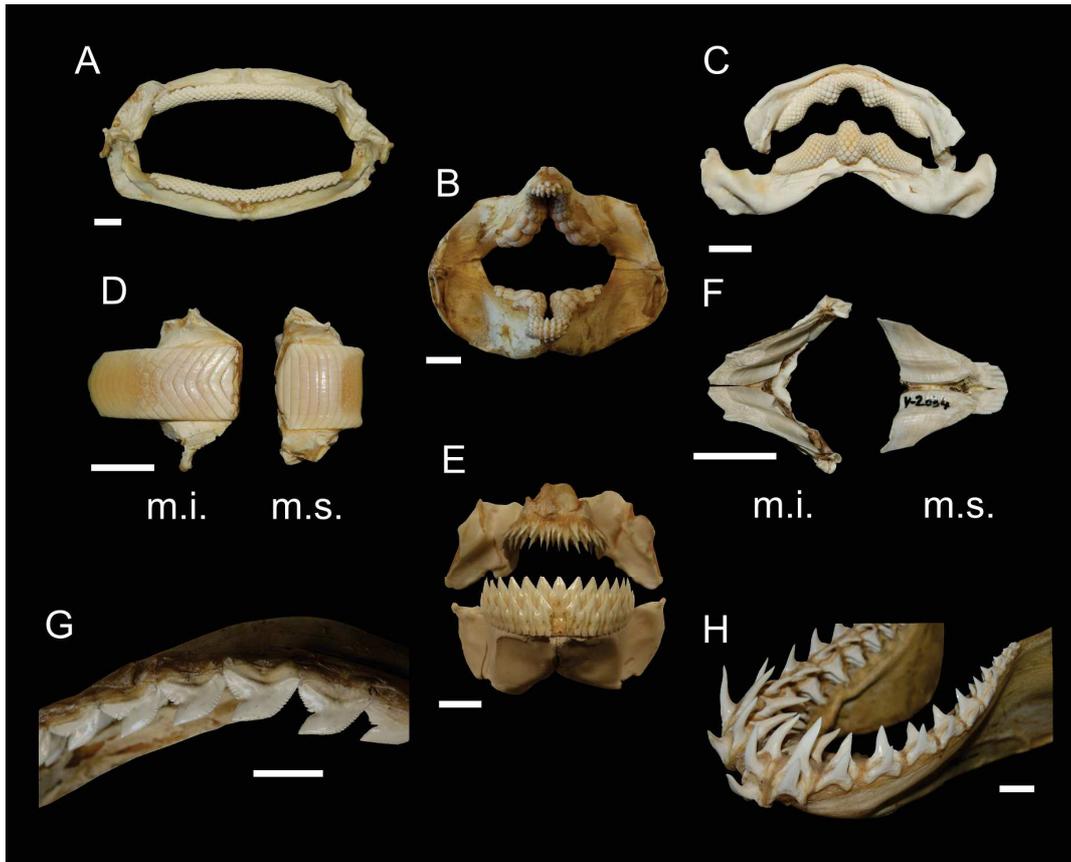


FIGURE 5. – Morphologie dentaire et hétérodontie chez les chondrichthyens actuels : **A** : *Plesiobatis daviesi* (type écraseur), **B** : *Heterodontus portusjacksoni* (type agrippeur-broyeur), **C** : *Rhina ancylostoma* (type écraseur), **D** : *Aetobatus narinari* (type broyeur), **E** : *Dalatias licha* (type coupeur-agrippeur), **F** : *Hydrolagus* sp., **G** : *Galeocerdo cuvier* (type coupeur), **H** : *Isurus oxyrinchus* (type arracheur) . Échelle : 2 cm

isolées compte tenu de leur polyphyodontie. La minéralisation importante des structures dentaires les rend également propices à la fossilisation (Cappetta, 2012). Dans ce contexte, il est aisé de comprendre l'importance des caractères dentaires, qu'ils soient morphologiques ou histologiques, dans l'étude de l'évolution des chondrichthyens.

La dentition des sélaciens est également marquée par une forte hétérodontie, désignant les variations de la morphologie dentaire en fonction de la position des dents sur la mâchoire d'un même individu, de leur sexe ou encore de leur âge. Ces caractéristiques peuvent rendre l'identification des espèces difficiles tant que les limites de la variation morphologique ne sont pas bien établies (Cappetta, 1986). Il est cependant possible de définir un nombre relativement réduit de types dentaires adaptatifs, associés à différentes spécialisations trophiques (Cappetta, 1986). Des exemples de ces types dentaires adaptatifs sont présentés dans la figure 5.

4. Les chondrichthyens dans le registre fossile

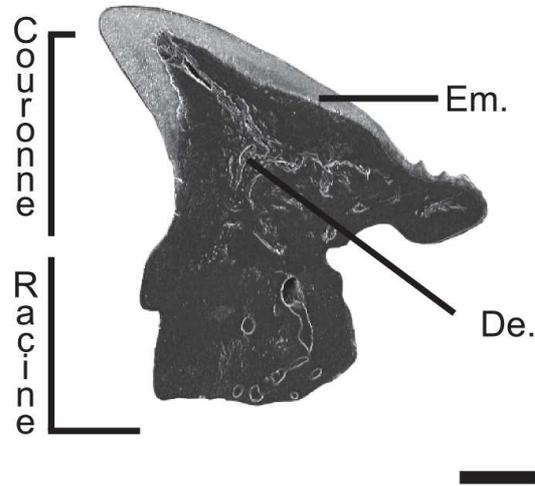


FIGURE 6. – Coupe transversale de dent antérieure d'*Heterodontus* sp. Échelle : 0,5 cm

La structure caractéristique d'une dent de chondrichthyen inclut une base (ou racine), qui permet la fixation au cartilage de la mâchoire et une couronne composée de dentine et recouverte par un tissu hyperminéralisé, l'émailloïde (figure 6). La variabilité observée très tôt au sein des tissus composant ces différentes parties a généré un nombre considérable de travaux et des résultats parfois contradictoires. Les tissus composant la base de la dent ont notamment été décrits comme de l'os acellulaire (Kemp & Westrin, 1979; Reif, 1980a; Smith & Hall, 1990), du ciment (Clement, 1986; Hertwig, 1874) ou bien diverses formes de dentine, en particulier de l'ostéodentine, qui présente des ressemblances superficielles avec l'os, ou plus rarement de l'orthodentine, caractérisée par des processus odontoblastiques de diamètre plus réduit (Cappetta, 2012; Moyer et al., 2015; Peyer, 1968; Zangerl et al., 1993). La couronne est constituée de dentine dont la nature est variable en fonction des groupes. Les deux grands types de dentine existant chez les chondrichthyens sont l'ostéodentine et l'orthodentine, eux mêmes subdivisés en différentes catégories en fonction de leurs variations morphologiques propres. De nombreux types de dentine ont ainsi été décrits, ce qui a poussé certains auteurs à tenter de les utiliser pour établir des relations évolutives entre des groupes variés (e.g. Orvig, 1967; Peyer, 1968; Poole, 1967). Ces descriptions permettent de classer les dents des néoséla-ciens en fonction de deux grands types d'organisation histologique (figure 7) : le type orthodonte (7-A), où la dent conserve une cavité pulpaire entourée par de l'orthodentine

4. Les chondrichthyens dans le registre fossile

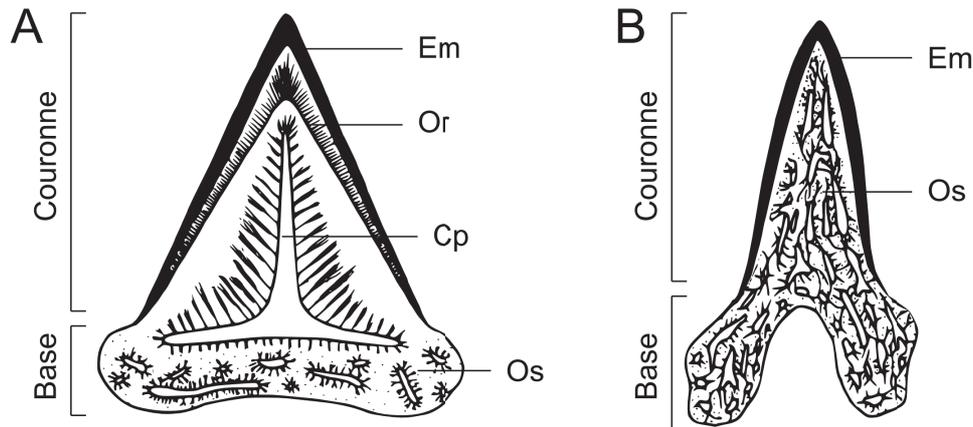


FIGURE 7. – Types dentaires histologiques des néosélaciens. **A** : type orthodonte (*Carcharhinus*). **B** : type ostéodonte (*Lamna*). Modifié d'après Moyer et al. (2015)

une fois formée et où la base est composée d'ostéodentine, et le type ostéodonte (7-B), où la cavité pulpaire est secondairement envahie par l'ostéodentine.

L'essentiel des controverses concernant les tissus dentaires des chondrichthyens porte toutefois sur le tissu hyperminéralisé recouvrant celles-ci, l'émailloïde, dont la nature et l'origine développementale sont débattues depuis plus d'un siècle (Prostak & Skobe, 1988a). En effet, si certains auteurs ont considéré ce tissu comme homologue avec l'émail des tétrapodes (Moss et al., 1964), ils sont pourtant caractérisés par des différences fondamentales. L'émail est un tissu d'origine ectodermique, résultant de la minéralisation d'une matrice extra-cellulaire non-collagénique et principalement composée de protéines spécifiques, les EMP (*Extracellular Matrix Proteins*) (Kawasaki, 2009a; Sire et al., 2005, 2007). Ces protéines sont sécrétées par les améloblastes, qui se différencient à partir de l'épithélium dentaire. Sa formation incrémentielle est postérieure à celle de la dentine sous-jacente, dont la matrice protéique est produite par les odontoblastes, qui dérivent du mésenchyme issu des cellules de la crête neurale (Sharpe, 2001). Au contraire, l'émailloïde a souvent été décrit comme un tissu d'origine développementale mixte, produit à la fois par les améloblastes et par les odontoblastes, bien que la contribution respective de chaque type cellulaire reste mal comprise. Sa matrice extra-cellulaire semble en tout cas riche en collagène, ce qui a conduit certains auteurs à le considérer comme une forme particulièrement minéralisée de dentine. Au contraire de l'émail, sa minéralisation est antérieure à celle de la dentine (Kemp, 1999; Tomes, 1898). Chez les chondrichthyens, la composante principale de ce tissu est la fluoroapatite, un phosphate de calcium riche en

4. *Les chondrichthyens dans le registre fossile*

fluoride, et plus résistant aux processus diagénétiques que les autres variétés d'apatite (Chen et al., 2014; Francillon-Vieillot et al., 1990). La structure cristalline micrométrique (microstructure) de ce tissu a notamment suscité un intérêt important de la part des paléontologues et des systématiciens dans la mesure où elle semble avoir une utilité taxonomique chez de nombreux groupes (Cappetta, 2012; Reif, 1977, 1978, 1980b; Zangerl, 1981).

En complément de la morphologie dentaire, les caractères histologiques ont donc été largement utilisés, permettant parfois l'identification et la classification de taxons fossiles aux affinités peu claires. Certaines classifications sont d'ailleurs basées exclusivement sur des caractères histologiques (Glikman, 1964). Une quantité importante de travaux a donc suivi ceux d'Agassiz (1833) et d'Owen (1840), souvent pour tenter d'élucider l'intérêt systématique et fonctionnel potentiel des caractères histologiques et microstructuraux, des questions qui ne sont toujours pas complètement résolues (Enault et al., 2015a).

5. Paléontologie et développement

Si la relation entre la paléontologie, basée sur l'étude d'organismes éteints, et la biologie du développement au sens large, portant quant à elle sur des organismes bien vivants, peut sembler contre-intuitive au premier abord, l'histoire des deux disciplines est pourtant marquée par une suite quasi continue d'interactions. Pour mieux comprendre les modalités de cette complémentarité, il faut remonter au 19^{ème} siècle. La paléontologie, sous l'influence de Cuvier (1769-1832), Lamarck (1744-1829) et d'autres, est alors une discipline scientifique en plein essor. Étroitement associée à l'anatomie comparée, elle n'est cependant pas abordée dans un cadre évolutif de prime abord (Hall, 2003). Si plusieurs scientifiques, notamment Lamarck (1744-1829) et St-Hilaire (1772-1844) baseront les prémices de leur vision évolutive du vivant sur le registre fossile, c'est la publication de *De l'origine des espèces*, en 1859 (Darwin, 1859), qui enracine finalement la paléontologie dans les sciences de l'évolution. La fin du 19^{ème} siècle est également marquée par le développement de l'embryologie, précurseur de la biologie du développement actuelle et elle aussi fortement influencée par l'anatomie comparée. Plusieurs anatomistes et paléontologues vont alors se tourner vers cette discipline pour tenter de comprendre l'origine de la variation observable dans les organismes vivants et fossiles. Les intérêts des deux disciplines convergent sur un certain nombre de points, l'origine de la diversité des formes vivantes donc, et de la complexité morphologique, mais considèrent ces questions à deux échelles différentes : le temps très court du développement embryonnaire, ou bien le temps géologique, beaucoup plus long.

Des parallèles sont rapidement tracés entre le développement individuel d'un organisme et l'histoire évolutive du groupe auquel il appartient, et plusieurs théories ont cherché à mettre en lumière les relations entre ontogénie et phylogénie, ce qui a notamment donné naissance à une série de "théories de recapitulation" depuis les travaux d'Étienne Serres (1786-1868) et de Johann Friedrich Meckel (1781-1833) dans les années 1820, à sa

5. *Paléontologie et développement*

formalisation la plus connue par Haeckel (1834-1919) en 1866. Ce dernier tente ainsi de concilier les itérations antérieures des théories récapitulatives avec les concepts évolutifs issus à la fois des travaux de Darwin et de Lamarck.

D'autres embryologistes ont cependant une vision différente des relations entre le développement embryonnaire et l'évolution, c'est par exemple le cas de Wilhelm His (1831-1904) et de Karl Ernst Von Baer (1792-1876), dont les « lois embryologiques » prendront le pas sur les théories de Haeckel, et auront une influence importante sur les travaux de plusieurs anatomistes et paléontologues, en particulier Richard Owen (1804-1892). Quelques autres contributions importantes de l'embryologie concernent par exemple les travaux de Henri Milne-Edwards (1800-1885), qui préconise l'étude d'embryons pour retracer les relations d'homologie entre des structures d'organismes adultes, ou ceux de Gavin de Beer (1899-1972), à l'origine du concept des hétérochronies du développement, qui tient toujours une place centrale dans la compréhension de la variation morphologique.

Après plus d'un siècle d'interactions entre ces deux disciplines, l'embryologie est pourtant la grande absente de la théorie synthétique de l'évolution, tandis que la paléontologie y figure en bonne place. Il faut attendre les années 1970 et notamment les travaux de Stephen Jay Gould (1941-2002), pour ramener l'embryologie au centre des considérations évolutives, et poser les bases de ce qui sera par la suite appelé biologie évolutive du développement, ou plus couramment « évo-dévo ». Si les contours de cette discipline ne sont pas toujours bien définis, elle cherche cependant à expliquer la diversité morphologique actuelle, l'origine d'innovations morphologiques et de manière générale les relations existantes entre le génotype et l'évolution du phénotype en s'intéressant aux mécanismes développementaux qui sous-tendent cette variation. Si Gould remet au goût du jour les hétérochronies de Gavin de Beer, c'est l'avènement de la génétique du développement, et la découverte des gènes homéotiques à la fin des années 1970, véritable “boîte à outils” génétique partagée par l'ensemble du règne animal, qui marque réellement l'essor de l'évo-dévo. Très à la mode depuis les années 2000, cette discipline se décline en une multitude de variantes, par exemple l'« éco-évo-dévo » quand les interactions entre l'environnement et le développement sont considérées, ou la « paléo-évo-dévo » quand ces approches sont appliquées à des problématiques paléontologiques. D'autres thématiques telles que la plasticité phénotypique, la canalisation ou l'évolvabilité sont également ré-

5. Paléontologie et développement

currentes, ce qui fait finalement de l'évo-dévo une discipline assez polymorphe.

Les organismes modèles récurrents en évo-dévo sont directement hérités de l'embryologie, et sont pour la plupart restreints aux ostéichthyens, ou bien sont situés à l'extérieur des deutérostomiens (*Drosophila*, *Caenorhabditis*), réduisant finalement la perspective phylogénétique à des groupes assez restreints (Jenner & Wills, 2007). L'étude d'organismes "non-modèles" rendue difficile par l'absence de lignées transgéniques et de données génomiques, tend cependant à se généraliser, permettant ainsi une compréhension plus globale de l'évolution du vivant. Dans ce contexte l'étude des chondrichthyens comme organismes non-modèles dans une perspective évo-dévo semble non seulement pertinente, mais également nécessaire pour i) appréhender l'ensemble de la diversité des gnathostomes actuels, et ii) permettre une meilleure compréhension, par approche comparative avec les ostéichthyens, des événements évolutifs ayant mené à cette diversité.

Ces dernières années, trois organismes « non-modèles » ont été proposés chez les grands groupes de chondrichthyens actuels : la petite roussette (*Scyliorhinus canicula*) chez les requins, la raie épineuse (*Leucoraja erinacea*) chez les raies, et la chimère éléphant (*Callorhynchus millii*) chez les chimères. Les deux premiers offrent les avantages d'une taille relativement réduite, d'une reproduction ovipare (permettant un accès régulier aux embryons à différents stades de développement), et d'un maintien assez aisé en captivité. La chimère éléphant est en revanche plus difficile d'accès et de maintien (Boisvert et al., 2014), mais son génome de petite taille comparé à celui des autres chondrichthyens en a fait un modèle plus attractif (Venkatesh et al., 2005) et son génome complet est disponible depuis peu (Venkatesh et al., 2014). Des données génomiques sont également disponibles pour les deux autres espèces, grâce aux efforts du Génoscope en France (*Scyliorhinus*) et du NEBC (*North East Bioinformatics Collaborative*) aux États-Unis (*Raja*). Les chondrichthyens ont donc généré un intérêt croissant en biologie du développement ces dernières années (Compagnucci et al., 2013; Debiais-Thibaud et al., 2011; Gillis et al., 2009a; Gillis & Shubin, 2009; Johanson et al., 2013; Oulion et al., 2011; OShaughnessy et al., 2015), ce qui, associé à des caractères anatomiques uniques (squelette interne cartilagineux, calcification prismatique, ptérygopodes pelviens...) et à l'inversion de paradigme évolutif mentionné plus haut, en fait un groupe d'étude particulièrement attrayant en biologie de l'évolution et du développement.

6. Problématique et plan

Compte tenu de leur diversité au sein des vertébrés fossiles et actuel, les dents sont une des structures squelettiques les mieux étudiées et de très nombreux travaux leur ont été consacrés, portant sur leur développement, leur structure, leur évolution et leur fonction au sein de différents groupes (Cappetta, 2012). Plusieurs auteurs se sont notamment intéressés à la microstructure des tissus dentaires hyperminéralisés, abordée plusieurs fois dans les sections précédentes. Celle-ci a principalement été étudiée chez les mammifères, chez lesquels la microstructure de l'émail s'est révélée une source importante de nouveaux caractères pour la reconstruction des relations phylogénétiques de plusieurs groupes. Ils sont particulièrement importants lorsque des formes fossiles sont considérées, ou pour évaluer des hypothèses adaptatives (i.e. Stefen & Rensberger, 2002).

Moins connus chez les autres vertébrés, les caractères dentaires microstructuraux ont cependant été utilisés chez plusieurs groupes non mammaliens (Hwang, 2005, 2011; Heckert & Miller-Camp, 2013). Ils sont également utilisés depuis plus de quarante ans chez plusieurs groupes de chondrichthyens, dont les caractères dentaires sont d'autant plus importants que le reste du squelette est rarement préservé à l'état fossile. Ces caractères ont été largement utilisés dans un contexte taxonomique (Reif, 1977; Cuny & Benton, 1999) bien qu'en réalité un nombre très limité de taxons ait été échantillonné comparé à la diversité importante du groupe. La microstructure dentaire est ainsi censée permettre de différencier les dents des néosélaciens de celles de tous les autres chondrichthyens dans le registre fossile. Celle des raies, formant le clade de chondrichthyens le plus diversifié à l'heure actuelle, demeure pourtant virtuellement inconnue.

La première partie de ce travail de thèse porte donc sur la diversité de microstructures dentaires existant chez les batoïdes, en se basant sur un large échantillonnage taxonomique couvrant la diversité actuelle et fossile du groupe. Les données obtenues chez les batoïdes y sont ensuite replacées dans le contexte plus large de l'évolution de la micro-

6. Problématique et plan

structure de l'émailloïde chez les néosélaciens. L'existence au sein de ce clade de taxons possédant des spécialisations trophiques très marquées, aussi bien chez les raies que chez les requins, en fait un groupe idéal pour évaluer des hypothèses adaptatives fréquemment invoquées pour tenter de décrire certaines morphologies des tissus hyperminéralisés. Ces données y sont également confrontées à différentes hypothèses phylogénétiques, ce qui permettra de statuer sur l'intérêt potentiel de l'utilisation de ces caractères chez les néosélaciens.

La deuxième partie est consacrée aux variations de microstructure dentaire dans une perspective développementale, pour tenter de faire le lien entre des données issues du registre fossile des néosélaciens et des données de génétique du développement. Cette partie porte sur l'odontogénèse de trois espèces actuelles : un requin, la petite roussette (*Scyliorhinus canicula*) et deux raies (*Raja clavata* et *R. asterias*). Leur développement dentaire y est décrit à travers une approche histologique, ultrastructurale et transcriptionnelle, chez des embryons et des individus adultes.

Enfin, après avoir abordé le squelette dermique des néosélaciens, la troisième partie de ce manuscrit porte sur leur squelette interne à travers deux approches complémentaires : une approche morphologique dans un premier temps, focalisée sur la formation et la séquence de calcification de certains éléments du squelette interne au cours du développement embryonnaire, suivie d'une approche développementale, permettant de préciser le contexte moléculaire de la calcification du squelette interne. Ce chapitre traite principalement de la squelettogénèse chez la petite roussette, *Scyliorhinus canicula*. Les données obtenues dans cette partie doivent permettre de disposer de points de comparaison tangibles avec la squelettogénèse et la nature des tissus squelettiques chez d'autres chondrichthyens, dont le squelette interne peut être très modifié suite à des adaptations à certains modes de locomotion ou de prédation. Plus largement ces données pourront également être comparées avec ce qui est décrit chez les ostéichthyens, dont les tissus squelettiques sont mieux connus d'un point de vue morphologique aussi bien que moléculaire.

Deuxième partie .

Matériel et Méthodes

7. Matériel

7.1. Matériel dentaire fossile et actuel

L'ensemble du matériel dentaire échantillonné pour les analyses de microstructure est d'âges et de provenances variables. La majorité des spécimens appartient à la classe des batomorphes (90 taxons, 56 genres, 249 spécimens), bien que plusieurs sélachimorphes aient également été analysés (15 taxons, 11 genres, 50 spécimens). Le matériel fossile était quasi-exclusivement constitué de dents isolées, sélectionnées en fonction de leur état de préservation et pour obtenir un recouvrement maximum de l'histoire évolutive et de la diversité taxonomique des raies. Le matériel récent consistait principalement en des dents de raies et de requins extraites directement de mâchoires préparées d'individus sexés et mesurés, ce qui a permis d'éviter les premières rangées dentaires et ainsi de limiter les biais d'observation liés à l'usure fonctionnelle des dents. En fonction de la disponibilité du matériel, mâles et femelles ont été échantillonnés afin d'évaluer les éventuelles variations de microstructure liées à l'hétérodontie gynandrique des chondrichthyens. Dans le cas des requins-scies et des poissons-scies (Pristidae, Pristiophoridae, Sclerorhynchidae), des observations ont été réalisées sur les denticules rostraux en plus des dents orales dans la mesure du possible. La majorité du matériel dentaire provient des collections du laboratoire de paléontologie de l'ISE-M. Une liste détaillée des spécimens analysés, leur provenance, âge, ainsi que d'autres informations complémentaires, sont disponibles en annexe A. Le cadre systématique et la terminologie dentaire adoptés au cours de ce travail sont basés sur les travaux de Cappetta (2012) et la terminologie relative à la microstructure dentaire sur Enault et al. (2015a).

7. Matériel



FIGURE 8. – Élevage de *Scyliorhinus canicula* : **A** : adultes. **B** : récolte des oeufs fécondés. **C** : embryon et vitellus visibles à travers l'oothèque. Photos : M. Debiais-Thibaud & A.-L. Charruault.

7.2. Matériel biologique

Les embryons de petite roussette (*Scyliorhinus canicula*) proviennent de l'élevage mis en place à la Station Méditerranéenne de l'Environnement Littoral (SMEL, OSU-OREME, Sète) pendant l'année 2013 (figure 8-A). Un groupe de 16 adultes, constitué de 12 femelles et de 4 mâles pêchés en mer Méditerranée est maintenu dans un bassin de 2mx2mx0,7m à une température régulée de 18°C. Les œufs fécondés (figure 8-B-C), récupérés chaque semaine ou toutes les deux semaines ont ensuite été conservés à l'ISE-M dans un aquarium d'eau de mer, à température constante de 17°C. A cette température, le développement embryonnaire observé pour la population est de moins de 6 mois. Des dissections régulières ont permis de fixer un nombre important d'embryons à différents stades de développement. Ce dernier peut être déterminé en se basant sur la table de développement de Ballard et al. (1993), ou, pour les stades tardifs, en fonction de la longueur de l'embryon. Les embryons de raie bouclée (*Raja clavata*) nous ont été fournis par Arnaud Decaix (Mareis, Etaples-sur-Mer) qui nous a envoyé 10 œufs à un stade avancé de développement. La durée d'incubation de ces œufs est de 7 mois à 13°C avant éclosion, et tous les embryons obtenus étaient au même stade de développement (stade 33 (Maxwell et al., 2008)). Les embryons de roussettes et de raies ont d'abord été extraits mécaniquement des œufs, puis euthanasiés par overdose de tricaine (MS-222) avant dissection et fixation. Dans le cas d'extraction d'ARNm ou d'ADN, les tissus ont directement été prélevés pour la suite du protocole. Les tissus frais ont été fixés au paraformaldéhyde (PFA) 4% dans du PBS 1X pendant 24-48h, rincés dans du PBS 1X, puis transférés dans de l'EtOH 100° et stockés à -20°C.

7. Matériel

Des échantillons de tissu supplémentaires proviennent de la pêcherie locale (*Raja asterias*) ou bien de spécimens préservés en éthanol et collectés par Henri Cappetta (ISE-M, *Squalus acanthias*, *Scyliorhinus canicula*) et Giuseppe Notarbartolo Di Scira (Tethys Research Institute, Mobulidés) et conservés dans les collections de l'ISE-M, Université de Montpellier. La liste du matériel biologique utilisé pour les hybridations *in situ*, les coupes histologiques, les observations en microscopie à transmission et la microtomographie à rayons-X est disponible en annexe A.

8. Méthodes

8.1. Microscopie électronique à balayage

L'étude de la microstructure dentaire a principalement été réalisée par observation au microscope électronique à balayage (MEB) sur des dents complètes ou sur des coupes. Lorsque des coupes ont été réalisées dans des séries dentaires ou dans des dents isolées, les spécimens ont d'abord été inclus dans une résine époxy transparente. Les blocs de résine ont ensuite été poncés au lapidaire (Struers Labopol-5) jusqu'à obtenir le plan de coupe désiré (sections longitudinales dans le sens labio-lingual dans la majorité des cas) et polis (voir Enault et al. (2015a) pour une discussion des techniques de préparation). Les coupes réalisées ont ensuite été mordancées à l'acide chlorhydrique (HCl) dilué à 10% pendant une durée de 5 à 10 secondes. Les échantillons ont ensuite été rincés à l'eau distillée puis séchés à l'air libre. Les dents entières ont été mordancées de la même manière, mais par application sélective de l'acide à certains endroits de la couronne, pour en révéler la microstructure. Les dents des spécimens actuels se sont systématiquement révélées plus difficiles à observer que le matériel fossile, ce qui semble dû à la persistance de matériel organique à l'intérieur de la dent, dans l'émailloïde et dans la dentine. Pour pallier à ce problème, de nombreux traitements chimiques et mécaniques ont été testés sur du matériel dentaire abondant, en particulier des rinçages de durées variables dans de l'eau de javel, du peroxyde d'hydrogène ou de l'hydroxyde de potassium. Ces traitements ne se sont cependant pas révélés concluants. Pour l'observation au MEB, les échantillons doivent être complètement déshydratés et rendus conducteurs. Ils sont donc métallisés avec un alliage or-palladium ou platine. Les observations ont ensuite été réalisées sur les appareils suivants : Hitachi S-4000 (CRIC, IURC, Montpellier, observations réalisées avec Chantal Cazevielle), Hitachi S-4800 (IEM, CNRS, Montpellier, observations réalisées avec Didier Cot).

8.2. Microscopie électronique à transmission

Des échantillons de tissus ont été prélevés sur des embryons de *Scyliorhinus canicula* et *Raja clavata* pour observation au microscope électronique à transmission (TEM). En raison de la taille très réduite (\varnothing 5 mm) des grilles d'observations, les échantillons ont préalablement dû être réduits au maximum pour conserver uniquement la zone d'intérêt (série dentaire pour les mâchoires, arcs neuraux pour les vertèbres). Des observations ont été ainsi réalisées sur des vertèbres et des mâchoires inférieures des deux espèces. Les échantillons conservés en éthanol sont post-fixés au glutaraldéhyde 2,5% pendant une durée minimum de 2 heures, rincés dans du tampon phosphate 0,1M puis fixés une nouvelle fois pendant 2 heures au tétr oxyde d'osmium. Ils ont ensuite été rincés à l'eau, et déshydratés dans des bains successifs d'EtOH et inclus dans de la résine époxy Epon. Les blocs ont été laissés à polymériser pendant 3 jours à 65°C, avant la réalisation des coupes semi-fines de 300 nm d'épaisseur (pour coloration au bleu de méthylène) puis celle des coupes finales de 70 nm d'épaisseur. Les observations ont été réalisées sur un Hitachi H-7100 au SCME (Service Commun de Microscopie Electronique, Université de Montpellier, coupes réalisées par Véronique Viguière).

8.3. Histologie

Avant la réalisation des coupes, les échantillons stockés en éthanol sont réhydratés dans du PBS puis décalcifiés dans une solution de MORSE (10% Citrate de sodium, 20% Acide formique) pendant deux à cinq jours en fonction de la taille et du type d'échantillon, à température ambiante. La solution de MORSE est renouvelée une fois pendant la période de décalcification. Les spécimens ont ensuite été stockés en EtOH 70° à 4°C en attendant la coupe. Les inclusions en paraffine, coupes et colorations ont été réalisées au plateau RHEM de l'IRCM (Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier). Les coupes ont été effectuées à 10 μ m d'épaisseur et cinq colorations différentes ont été réalisées sur chaque échantillon :

- *Hématoxyline Eosine Safran* (HES) : La coloration hématoxyline-éosine permet la mise en évidence du noyau (violet) et du cytoplasme (rose). Le safran colore les fibres de collagène de la matrice extra-cellulaire (rose/orange) et les hématies

8. Méthodes

(rouge/orange).

- *Trichrome de Masson* (TM) : Cette coloration permet la mise en évidence des fibres de collagène (bleu). Les noyaux apparaissent violet foncés, le cytoplasme, les muscles et les hématies rouge ou rose.
- *Réticuline* (RET) : Colore les fibres de réticuline (Collagène de type III) en noir et les autres types de collagène et le tissu conjonctif en brun.
- *Weigert* (WEI) : Cette coloration marque les fibres élastiques en violet intense à noir, sur fond tissulaire violet pâle. Bien que réalisée sur tous les échantillons histologiques, cette coloration n'est pas figurée dans les planches de la partie 4 du manuscrit, dans la mesure où aucune fibre élastique n'a pu être mise en évidence de manière convaincante au sein des tissus étudiés. N'apportant pas d'information supplémentaire par rapport aux autres colorations utilisées, le choix a été fait de la laisser de côté.
- *Periodic Acid Schiff-Bleu alcian* (PAS-BA) : le PAS permet de révéler la présence de glycosaminoglycannes neutres et les membranes basales en magenta. Les noyaux apparaissent bleu-noir. Le bleu alcian permet quant à lui de colorer les glycosaminoglycannes acides et certaines glycoprotéines. Ces propriétés en font un excellent colorant des tissus cartilagineux.

Une double coloration au bleu alcian et rouge d'alizarine (voir section 8.8) a également été effectuée sur des coupes (12-14 μm) réalisées au cryostat sur des tissus non déminéralisés.

Chaque protocole de coloration détaillé est disponibles en annexe B. Les lames ont ensuite été scannées à X20 et X40 avec un Hamamatsu Nanozoomer 2.0-HT Slide Scanner à l'INM (Institute for Neurosciences Montpellier) dépendant de la plate-forme MRI.

8.4. Données de séquences d'ADNc de roussette et de raie

Les données de séquences liées à la banque d'ADNc de *Scyliorhinus canicula* nous ont été fournies par Didier Casane (LEGS, UPR9034, Gif-sur-Yvette) et regroupent le séquençage partiel de clones issus d'ADNc de plusieurs stades embryonnaires différents (voir Oulion et al. (2011)). La séquence codante des gènes ciblés a d'abord été récupérée chez différents vertébrés dans la base de données NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

8. Méthodes

Ces séquences de référence ont ensuite été utilisées pour des recherches de similarité dans les séquences d'ADNc à disposition (outil BlastMyDatabase de la plate-forme MBB (*Montpellier Bioinformatics Biodiversity*)), ce qui a permis d'identifier les séquences présentant des scores de similarité significatifs. Les séquences les plus similaires aux séquences de référence ont ensuite été utilisées pour identifier les séquences de maximum de similarité dans la base de données NCBI pour des organismes dont le génome est bien annoté, comme l'homme ou la souris (BLAST retour). Pour confirmer l'identité des séquences ainsi isolées, leur alignement avec les séquences protéiques issues de plusieurs taxons de vertébrés a été utilisé pour obtenir les relations phylogénétiques entre gènes. Afin de vérifier leurs relations d'orthologie, la reconstruction des arbres phylogénétiques a été effectuée avec MEGA6 (Tamura et al., 2013) par maximum de vraisemblance (bootstrap : 500 répliquions ; modèle : LG+G4). Après identification des séquences codantes, des primers spécifiques d'environ 18-20 bp ont été dessinés pour obtenir des séquences amplifiées d'environ 600-800 bp. Les numéros de référence des séquences, les primers utilisés ainsi que tous les numéros d'accèsion des séquences récupérées sur la base de données NCBI sont disponibles en annexe C. Des données de séquence de *Raja clavata* ont également été obtenues par l'équipe de Jean-Yves Sire (UMR7138, UMPC) dans le cadre de l'ANR JAWS par séquençage haut-débit à partir d'ADNc. L'extraction des ARNm a été effectuée sur la mâchoire provenant d'un des spécimens de Mareis (voir section 7.2).

8.5. Préparation des sondes ARN

Pour la petite roussette, l'amplification initiale des séquences d'intérêt a été réalisée avec un primer universel M-13 Forward et un primer spécifique, à partir des clones d'ADNc de la banque mise à disposition par Didier Casane, pour obtenir un amplifiat d'environ 600 à 1000 pb. Pour la raie bouclée, les séquences amplifiées à partir d'un extrait d'ADNc ont été liguées dans des vecteurs plasmidiques pGEM-T (Kit Promega), et transformées dans des bactéries compétentes (*E. coli* : OneShot TOP10 ou kit Promega TM109). Une fois le sous-clonage effectué, les colonies transformées ont été remises en culture et testées par PCR avant extraction (Mini kit Qiagen) de l'ADN plasmidique. Le séquençage de chaque insert a été effectué à la plate-forme Génotypage-Séquençage (ISEM, LabEx

8. Méthodes

CeMEB) et la synthèse des sondes à l'INM (Institute for Neurosciences Montpellier), où les hybridations *in situ* ont également été réalisées avec l'aide de Stéphanie Ventéo.

8.6. Hybridations *in situ*

Les tissus d'intérêt (mâchoires, vertèbres) prélevés sur les embryons ont été transférés dans du sucrose 30% à 4°C O/N. Les coupes (12-14 μm) ont été réalisées au cryostat sur les tissus non déminéralisés. Les lames, stockées à -20°C ont d'abord été séchées à température ambiante. La sonde a ensuite été diluée (au 1/50^{ème} ou au 1/100^{ème}) dans le tampon d'hybridation puis déposée sur les lames, pour une hybridation pendant la nuit à 70°C. Après une série de rinçages, une solution de blocage a été déposée sur les lames afin de saturer les sites de fixation aspécifiques des protéines. Un anticorps anti-digoxygénine, couplé à une enzyme (phosphatase alcaline) permettant de reconnaître la sonde, a été ensuite dilué (au 1/2000^{ème}) dans la solution de blocage et déposé sur les lames pour une incubation pendant la nuit à 4°C. Les lames ont ensuite été à nouveau rincées, avant la révélation des sites de fixation de l'anticorps par addition d'un substrat (NBT) et d'un catalyseur (BCIP), entraînant la formation d'un précipité bleu-violet permettant la localisation du transcrit dans les tissus. Les lames ont ensuite été séchées à l'air libre, puis montées avec du mowiol. Le protocole détaillé de la procédure est disponible en annexe D.

8.7. Microtomographie à rayons-X

L'acquisition des données a été réalisée à la station d'imagerie MRI hébergée à l'ISEM sur un microtomographe Skyscan 1076 avec une résolution de 18 μm . Étant donné la nature peu minéralisée des échantillons, ceux-ci ont été scannés sans filtre et avec une configuration "low", associée à des valeurs de tension peu élevées, ce qui convient à des objets peu denses. Les spécimens, stockés en EtOH 100° ont été rincés pendant 30 minutes dans du PBS 1X avant d'être transférés dans des sacs hermétiques pour l'acquisition des radios. Une fois la procédure terminée, les embryons ont de nouveau été stockés en EtOH 100° à -20°C. La reconstruction des coupes a été effectuée sur le logiciel NRecon et les coupes virtuelles reconstruites visualisées sur FIJI ou ImageJ, qui

8. Méthodes

permettent des manipulations basiques des séquences d'images. Les scans ont ensuite été traités sur le logiciel Avizo 7.1, qui permet de générer les isosurfaces des objets scannés ou la segmentation des régions d'intérêt.

8.8. Colorations au bleu alcian et au rouge d'alizarine

Cette technique, principalement adaptée des travaux de Davis & Gore (1936) et Dingerkus & Uhler (1977), permet la visualisation des parties cartilagineuses et minéralisées d'un embryon ou d'un organisme de trop petite taille pour être préparé selon des techniques de préparation classiques. Les spécimens utilisés ont été fixés au paraformaldéhyde (PFA) 4% dans du PBS 1X pendant 24-48h, rincés dans du PBS 1X, puis transférés et stockés dans de l'EtOH 100°. Avant coloration, les organes internes ont été retirés, et les spécimens ont été dépigmentés dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 3%. La coloration au bleu alcian, permettant de mettre en évidence les structures cartilagineuses se fait dans une solution de 70% EtOH, 30% acide acétique glacial, 200 mg/L de poudre de bleu alcian (Sigma). La solution doit être filtrée avant utilisation, et peut être conservée à 4°C. Les embryons ont été laissés dans la solution de bleu alcian entre 24 et 48h pour les plus gros spécimens. Les spécimens ont ensuite été passés dans des bains décroissants d'EtOH, rincés dans du PBS 1X, puis transférés dans une solution de trypsine 1% dans du borax (30% sodium borate saturé), qui permet la digestion enzymatique des tissus musculaires. Ces étapes permettent de rendre ces tissus transparents et d'éliminer la coloration non spécifique du bleu alcian. La digestion enzymatique peut être répétée si le spécimen n'est pas suffisamment transparent et que les structures cartilagineuses ne sont pas bien visibles. Les spécimens ont ensuite été rincés dans du PBS 1X puis passés dans la solution de rouge alizarine (0,01% rouge d'alizarine dans du KOH 0,5%) pendant 24h. Les spécimens ont ensuite été rincés dans du KOH 0,5%, et transférés dans une solution de glycérol de plus en plus concentrée (25%-50%-75% avec du KOH 0,5%) avant d'être stockés dans du glycérol pur. Les deux marquages peuvent être réalisés indépendamment l'un de l'autre et la procédure est relativement flexible, cependant, si les deux colorations sont effectuées sur un même échantillon, il est préférable de réaliser la coloration au bleu alcian avant la coloration de rouge d'alizarine afin de limiter la déminéralisation des parties calcifiées, la solution de bleu alcian étant acide.

8.9. Préparations ostéologiques

En raison de sa nature cartilagineuse, les données concernant la morphologie squelettique des chondrichthyens sont relativement rares, et limitées à certains groupes. Les techniques de microtomographie, si elles présentent des avantages évidents par rapport aux techniques plus classiques de visualisation et de préparation squelettiques (pas de déformation des parties cartilagineuses, connexions anatomiques parfaites, etc.), sont cependant limitées lorsque le squelette est peu calcifié, comme c'est le cas pour beaucoup de chondrichthyens. De même, la technique de double marquage détaillée dans la section précédente est surtout destinée à l'étude de stades embryonnaires ou d'individus de petite taille. Afin d'obtenir les données les plus complètes possibles et de disposer de références pour la morphologie adulte, plusieurs pièces squelettiques de *S. canicula* et de *R. asterias* ont été préparées suivant un protocole accepté pour publication dans le *Journal of Applied Ichthyology* et présenté dans la section suivante. Les pièces individuelles préparées selon ce protocole ont ensuite été séchées ou bien conservées dans du glycérol pur afin de limiter les déformations liées au séchage.

8.10. Manuscrit 1 : « A complete protocol for the preparation of chondrichthyan skeletal specimens »

A complete protocol for the preparation
of chondrichthyan skeletal specimens

Sebastien Enault, Camille Auclair, Sylvain Adnet, Mélanie Debiais-Thibaud

Manuscrit accepté dans le *Journal of Applied Ichthyology*, 2015

Title: A complete protocol for the preparation of chondrichthyan skeletal specimens

Authors: Sebastien Enault^{1,*}, Camille Auclair¹, Sylvain Adnet¹, Mélanie Debiais-Thibaud¹

Affiliation: ¹ Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier, UMR5554, Université Montpellier, CNRS, IRD, EPHE, Place Eugène Bataillon, CC064, 34095 Montpellier, France

* Corresponding author: sebastien.enault@univ-montp2.fr

Keywords: Chondrichthyan, Skeleton, Skull, Cartilage, Preparation

Abstract: The skeleton of cartilaginous fishes is notoriously difficult to prepare, and the literature dealing with the subject is extremely scarce compared to other vertebrate groups. As a result, chondrichthyan skeletal specimens held in museums and other scientific institutions are often limited to isolated set of jaws, taxidermised specimens and small individuals preserved whole in fluid. Yet, skeletal characters have repeatedly proven essential in numerous phylogenetical analyses, and skeletal specimens hold potential museographic interest as well. Here we briefly review the relevant literature and propose a new and simple protocol, involving limited and easily obtainable chemicals, for the quick preparation of clean and durable chondrichthyan skeletal specimens. We also discuss various features of the chondrichthyan skeleton, and investigate the microstructural effects of the chemicals involved in the protocol.

Introduction

Due to its entirely cartilaginous nature (Reynolds, 1897), the internal skeleton (Fig. 1) of chondrichthyans (sharks, skates, rays and chimaeras) is notoriously difficult to prepare, and the technical literature is very scarce compared to other vertebrate groups. In most museums and scientific institutions, these animals are usually preserved as whole specimens in fluids when their size allows it (although large specimens are also preserved on occasions (e.g. Human *et al.*, 2012)), as taxidermised specimens or more frequently as isolated sets of jaws (Sanda & De Maddalena, 2003a, b). However, endoskeletal characters have proven useful in numerous morphological and phylogenetical analyses (e.g. Shirai, 1992, Aschliman, 2011) therefore chondrichthyan skeletal material should not be overlooked in research collections. Skeletal specimens can also be of museographic interest, especially for the larger species, as exemplified by the recent recreation of a complete *Megaelachus megalodon* skeleton at the Calvert Marine Museum (Maryland, USA) or the complete *Lamna nasus* skeleton recently put on display at Exploramer, Quebec.

This work aims at offering a brief review of the technical literature regarding the endoskeletal preparation of chondrichthyan specimens and proposing a simple and effective technique for the preparation of their skeletal material.

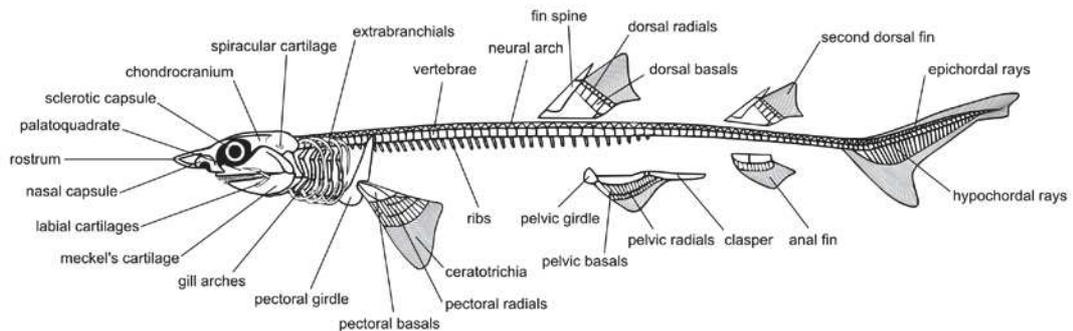


Figure 1: Schematic shark endoskeleton, lateral view. Modified from Compagno (1999).

Background

Historically, chondrichthyan skeletal material was generally first air-dried after manually scraping away the soft tissues. Other traditional preparation methods, such as prolonged maceration in water or boiling for prolonged periods of time would result in the complete destruction of the cartilaginous skeleton. The major drawback of this technique is that cartilage has a high tendency to warp, crack and shrink during the drying process, distorting the finished specimen (Hildebrand, 1968). The amount of distortion depends on numerous factors, both intrinsic, such as the degree of calcification (which varies depending on age, species and anatomical region-for example, jaws and vertebrae are usually more heavily calcified than the rest of the skeleton) and extrinsic, such as temperature and humidity level. A lot of work has thus been devoted to keep distortion to a minimum. A common practice for solving this problem is the preservation of complete, ligament-articulated skeletons in formalin or ethanol (Sanda & De Maddalena, 2003b). While it allows for very good

preservation of the most delicate parts, such as the branchial skeleton, the technique is however and often limited to small sized specimens and prevent handling of the material.

In what seems to be the oldest published reference on the subject, Parker (1881), outlined a method involving hot water baths to remove the soft tissues before impregnating the cartilage with glycerin jelly, a technique derived from the preparation of more fragile anatomical specimens, which minimizes shrinking and warping, and produces durable specimens that can be handled or displayed. While time consuming, this technique apparently yielded satisfactory results on a wide range of biological material, from invertebrate exoskeletons to a variety of soft tissues.

Over fifty years later, Tannheimer (1939) described a similar infiltration technique using paraffin. His work focused on preserved material of a single species, the spiny dogfish (*Squalus acanthias*), and involved numerous chemicals such as dioxane, aniline and xylene. The results were described as very satisfactory (although no illustration was provided) and producing durable specimens. In a very short paper Stolher (1945) quickly described a “slow method of infiltration” for bulk preparation of shark neurocranium for class use. His technique was also based on repeated hot water baths and removal of the soft tissues by hand. He then used compressed air to further clean the neurocranium before dehydration through graded concentrations of ethanol, then a mix of ethanol and toluene and finally pure toluene. He then gradually soaked the neurocrania in toluene and melted paraffin until pure paraffin is reached. Although this technique is applied to shark neurocrania and vertebrae segments only, it is undoubtedly applicable to other parts on the skeleton as well. He also noted that the length of the treatment varied among species, probably depending on the degree of calcification. Modern Hexanchiformes (cowsharks) for example, are very poorly calcified (Cappetta, 2012).

One of the most detailed works on the subject was done by Hildebrand (1968) who described both the preparation of dry and wet skeletal specimens. His technique for the preparation of dry cartilaginous skeletal material was essentially a simplified version of Tannheimer's (1939) and Stohler's (1945) techniques. It involved careful initial dissections to remove the soft tissues, successive hot-water baths (his work provided preferential temperature and soaking times), gradual dehydration in ethanol and then paraffin infiltration with toluene. It is also noted that paraffin can be used as an adhesive when articulating the various skeletal pieces. The author also noted that fresh specimens were preferable for skeletal preparation, since the hardened tissues of preserved specimens might prove very difficult to remove properly without damage to the delicate cartilaginous skeleton.

During the course of his extensive work on the Carcharhiniformes (ground sharks), Compagno (1988) also prepared and illustrated the neurocranium and other skeletal pieces of a great number of shark species. He used a more straightforward technique involving “hot water maceration” (although based on his description, it seems to be a hot-water soak rather than true maceration) and even boiling the neurocranium of large sharks for several hours. He also experimented with NaOH, KOH and NaClO solutions as well as trypsin maceration with mitigated results. His line drawings were most probably based on wet specimens, before warping and shrinking occurred.

Most of the works discussed here involve submerging the specimen in hot water for various lengths of time before fleshing and manual scraping of the soft tissues and disarticulating the

specimen for easier handling, and because different anatomical regions do not require the same amount of care. However, other techniques have been tried, such as cleaning with dermestid beetles (Hefti *et al.*, 1980) which can also produce excellent results (Stepanek & Kriwet, 2012), and cleaning with marine isopods (Packard, 1959). Modern imagery techniques such as X-ray computed tomography have made the investigation of chondrichthyan skeletal anatomy much easier (Maisey, 2004; Mollen *et al.*, 2012) and have given access to fine anatomical structures such as the inner ear in both extinct and extant chondrichthyans (Maisey, 2001). While extremely interesting and practical for scientific study, this does not work as well for species possessing a poorly calcified skeleton or for juveniles, and the obvious drawback of this technique beside its usually expensive nature is that the specimens cannot be displayed or handled physically.

Here we propose a new technique which is both relatively quick and easy for the production of clean and durable hard tissues of chondrichthyan specimens, such as neurocrania, whole skeletons or any other skeletal structures of interest.

Materials and methods

Material

Fresh specimens of starry ray (*Raja asterias*) and small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*) were obtained from local fish stores. Additionally, a blacktip reef shark (*Carcharhinus melanopterus*) was used in the study. This specimen, an aquaria casualty that was donated to the Paleontology Department of the University of Montpellier several years ago, had been kept frozen at -20°C since then. All material is deposited in the collections of the Paleontology Department of the University of Montpellier. The anatomical terminology used here to describe chondrichthyan skeletal pieces follows Compagno (1999)

Methods

Specimens were first measured, sexed and photographed prior to dissection and preparation. If the specimen was not to be prepared as a complete skeleton, heads were cut toward the last gill slit and individually frozen in plastic bags. Complete specimens were gutted and roughly fleshed, taking care not to damage internal structures such as the gills or short ribs of some shark species. Skinning is not necessary and the head should not be skinned since it often leads to broken structures (Compagno, 1988). Specimens were then taken apart in manageable sections (i.e., head and gills, fins, vertebral column). The vertebral column may need to be separated in several segments when dealing with large specimens (see Parker, 1881). Following the technical literature (Compagno, 1988; Hildebrand, 1968; Parker, 1881; Stohler, 1945) specimens were soaked in 50-60°C water from a few minutes to several hours and carefully dissected immediately afterward. Soaking times vary greatly depending on a number of factors, such as size, age, species and calcification, so specimens should be checked on a regular basis to prevent disintegration, especially for the most fragile structures, such as the fins and branchial skeleton. The process loosens skin, muscle and connective tissue which can then be easily dissected away from the skeleton, and most of the perichondrium can also be removed. This process was repeated as many times as needed, the neurocranium usually requiring the longest soaking time. Cleaning of the specimen can be interrupted at any time by freezing the parts in sealed plastic bags.

The cleaned skeletal parts are then transferred to a 1:1 solution of 50% ethanol and 10% H₂O₂. The hydrogen peroxide will react with the organic matter, and further soften the residual tissues making their removal easier, while the ethanol starts the dehydration process and prevents disintegration and maceration of the delicate cartilage parts. Specimens were left in the solution for durations varying between 30 minutes and two hours. As for the initial cleaning stage, specimens should be checked on a regular basis to prevent disintegration. Cartilage pieces are then thoroughly rinsed in water to remove the residual H₂O₂ and scraped again to remove the residual tissues. They are then dehydrated through a series of graded ethanol baths (50%-70%-95%). When the highest concentration is reached, the specimens can be left in for any duration without alteration. Following the recommendations of Hildebrand (1968), parts such as vertebrae and fins should be tied and splinted to prevent distortion and to allow them to harden in the desired position.

Cleaned specimens were then air dried, still tied and splinted in their natural position to keep the warping and shrinking to a minimum during the final drying process (see discussion for details).

Once dry, Paraloid B-72, an ethyl-methacrylate copolymer commonly used in conservation treatments was applied to the surface of the dry cartilage or when size permitted, the finished specimen was fully soaked in it to allow better penetration of the consolidant. Paraloid B-72 was dissolved in acetone 5% w/v (5g of PB-72 in 95ml acetone). At higher concentrations, Paraloid B-72 has a tendency to produce a shiny coating over the specimen, making it look plasticized. Specimens were then articulated using wire and glue (cyanoacrylate and polyvinyl acetate glue were used) when needed or kept as disarticulated comparative material.

Finally, to assess the effect of the initial ethanol-H₂O₂ solution on the cartilage, samples were cut from the Meckel's cartilage surface of both *Scyliorhinus canicula* and *Raja asterias* specimens and left in the solution for times varying between 30 minutes to 10 hours. These samples, along with a control sample were coated with platine prior to SEM analysis. SEM study was performed with a Hitachi S-4500 at the IEM in Montpellier using an acceleration voltage of 10 kV.

Results and discussion

The skeleton of chondrichthyans was fairly easy to clean using this technique, most of the difficulty consisting in keeping the warping and shrinking that occurred during the drying process down to a minimum. However, special care should be paid to some anatomical features which will be briefly reviewed by anatomical region here.

Cranial and branchial skeleton

The neurocranium (Fig. 2: A, B, C, D) was one of the longest but easiest part to clean. It is basically a cartilage box enclosing and protecting the brain which can easily be removed through the anterior fontanel. Overall it is sturdy, but the rostrum and nasal capsules should be handled with care. The scleral capsules (Fig. 1), present in most species (Pilgrim & Franz-Odenaal, 2009) should also be preserved for subsequent mounting on the finished specimen. Attention should also be paid to the optic pedicels (Fig. 2, B) supporting the scleral capsules and which are often very fragile and tend to shrink a lot when drying. The jaws should also be treated carefully, although the cartilage is very tough, teeth will fall out

easily if left too long in heated water. Accordingly, they can also be cleaned using cold water, which takes longer but make it easier to keep the teeth in place.

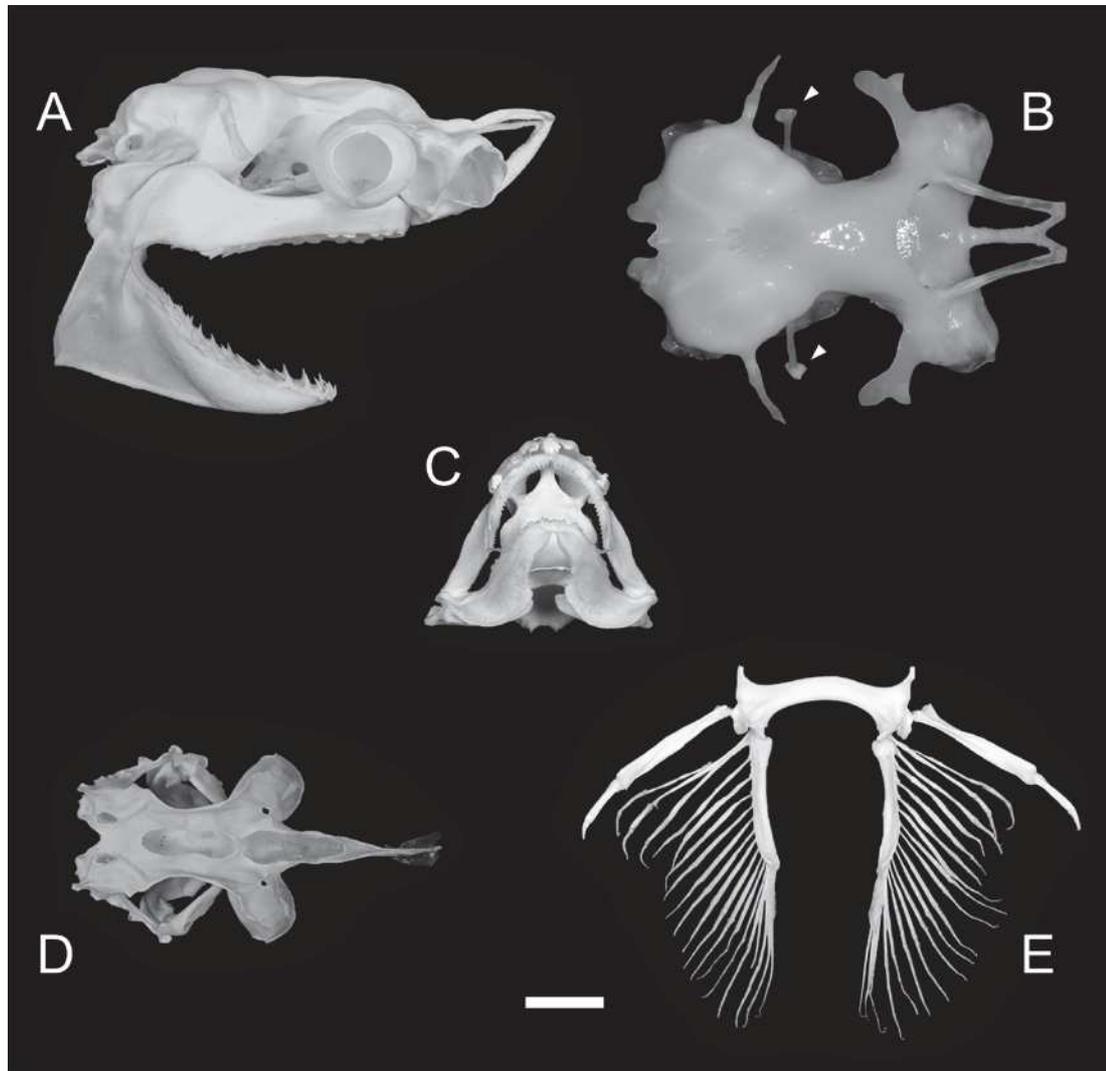


Figure 2: Chondrichthyan skeletal specimens. A: *Carcharhinus melanopterus* skull, lateral view. B: *C. melanopterus* skull, dorsal view, illustrating the optic pedicels (arrows). C: *Scyliorhinus canicula* skull, palatine view. D: *Raja asterias* skull, dorsal view. E: *R. asterias* pelvic fin, dorsal view. Scale bar: 2 cm

Many species also possess labial cartilages (Fig. 1), which can be very prominent, especially in chimaeras, greatly reduced, or even absent altogether (see Shimada *et al.*, 2009 for details). The branchial skeleton was the most difficult region to clean properly, and special care should be paid to the extrabranchials (Fig. 1), paired and elongated cartilages located around the branchial arches and which support the branchial septa. In small specimens, it is possible and recommended to keep the whole branchial skeleton in anatomical connection; however, it might need to be at least partially disarticulated on larger specimens for effective cleaning.

Vertebral column

The vertebral column was very straightforward to clean. Attention should be paid to the short ribs (Fig. 1) of some sharks and rays which are easily cut away during initial dissection. Caution should also be paid to the basiventral, basidorsal and interdorsal cartilages of the vertebral column during the hot water treatments. To keep the natural shape of the vertebral column, the centra should be pierced while wet and a rod inserted through them. Alternatively, the rod can be inserted in the neural canal, which is however not advised as it might damage the fragile neural arches. While this work only deals with shark and skate specimens, most of the techniques outlined here are also applicable to chimaeras, however it should be noted that the latter possess a persistent notochord. Despite the fact that no specimens were available for the present study and that Parker (1881) notes that no heat should be applied to those parts during the cleaning process, Hildebrand (1968) states that such structures can be prepared in a satisfactory way using his paraffin infiltration technique.

Appendicular skeleton

The appendicular skeleton will pose different degrees of difficulty depending on the species. In sharks, it is reduced and rather easy to clean. The scapulocoracoid (pectoral girdle) usually form a tough structure and can be prepared readily. Fins are also relatively easy to clean, however special care should be paid to the ceratotrichia which are usually very delicate due to their thin elastic nature. Alternatively, only the basal part of the fin (radials, propterygium, mesopterygium and metapterygium) can be cleaned, keeping intact the teguments on the distal part of the fin. Very little or no heat should be applied to the ceratotrichia, as it will cause them to warp extensively. The puboischiac bar (pelvic girdle) is tough and easy to clean. When present, fin spines (Fig. 1) pose no problem either. Rays and skate will be more difficult to prepare due to their greatly enlarged pectoral fins which are fused to the head. For members of this group, disarticulation of the anterior skeleton should be avoided as much as possible. In most species, the ceratotrichia are greatly reduced or lost altogether (Compagno, 1999), making it possible to clean the entirety of the fins (Fig. 2: E). In males, the claspers (cartilaginous structures used during reproduction, see Fig. 1) might pose additional difficulty since they possess a complex cartilaginous skeleton and should not be disarticulated during the preparation process.

Sensitivity to H₂O₂

Figure 3 illustrates the effects of H₂O₂ on the Meckel's cartilage of both *S. canicula* and *R. asterias* over a period of 14 hours. Remnants of the perichondrium covering the tesserae can still be seen in specimens that have not been exposed to H₂O₂ (Fig. 3 A, B). This organic layer was rapidly removed by the treatment, exposing the tesserae after approximately one hour (Fig. 3 C, D), which was most visible in the cartilage of *R. asterias* (Fig. 3 D). After removal of the superficial tissues, the treatment did not appear to significantly alter the cartilage surface over a time course of up to four hours of exposure (Fig. 3 C, D, E, F). However, the samples that were treated for fourteen hours (Fig. 3 G, H) showed significant alteration of the cartilage surface. The tesserae were much more visible, especially for the *S. canicula* specimen (Fig. 3 G). These samples were brittle once dry and exhibited a flaky surface. The hydrogen peroxide treatment did not appear to significantly alter or damage the cartilage if kept at low concentration and used for short periods of time. No significant

alteration to other structural features, such as tooth microstructure was noted (Enault *et al.*, 2013).

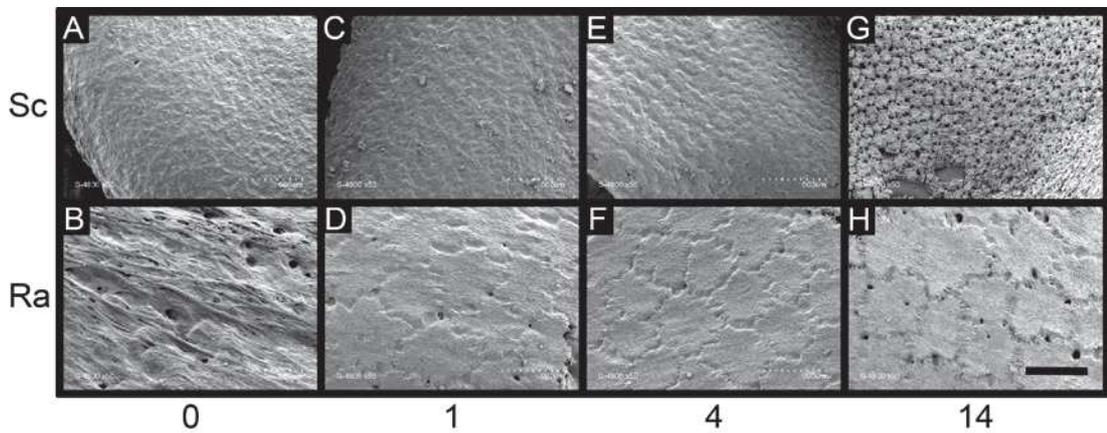


Figure 3: Effect of the EtOH-H₂O₂ solution on the Meckel's cartilage of two chondrichthyan species: *Scyliorhinus canicula* and *Raja asterias*. Scale bar: 600 μ m.

However, one of the major drawback of this chemical is that it will result in DNA damage (e.g. Lee *et al.*, 2010). Should prolonged exposure to hydrogen peroxide lead to cartilage damage and flaking, the paraloid coating will stabilize the specimen and prevent any further damage (Davidson & Brown, 2012). The combined use of H₂O₂ and ethanol will eventually result in an odor-free, and perfectly white specimen, which can be desirable for display purposes even though it may not be a priority in a research collection.

Further chemical treatment, such as degreasing, is an important step of bony vertebrate skeletal preparation, but was not deemed necessary with cartilaginous specimens since they did not exhibit any sign of grease even long after the parts were cleaned and dried. In case of contamination from the fat and oils from other body parts, such as the liver, the specimen can be soaked for a short while in acetone for proper degreasing. Prior to preparation, it is also advisable to consult the published literature, since several authors have described in detail the skeletal anatomy of numerous chondrichthyans (e.g. Allis, 1923; Compagno, 1988; Nishida, 1990) in order to get acquainted with the anatomy of several groups prior to the preparation of a specimen, so as not to miss or damage any small or fragile structure.

Although this work focuses on fresh or frozen specimens, the technique described here was also tried on formalin and ethanol preserved specimens with mitigated results. These chemicals harden the soft tissues considerably, which makes them very difficult to remove. Furthermore, fixation in non-buffered formaldehyde can also lead to significant decalcification, and such specimens should be avoided and considered unsuitable for proper skeletal preparation.

Conclusion

This technique offers a quick and easy way to produce quality skeletal specimens of chondrichthyans using readily available and relatively safe chemicals compared to those

previously described in the relevant literature. While it may not reduce warping and shrinking as much as some other techniques mentioned here (see in particular the work of Hildebrand (1968)) it still provides very satisfactory results, and the use of Paraloid B-72 ensures strength and durability to the specimen.

Hopefully this work will motivate the integration of more chondrichthyan skeletal specimens in the collections of museums and universities since this type of preparation is usually under-represented in these institutions.

Acknowledgements

We thank Jean-Christophe Theil and Michel Bourque for the numerous discussions regarding the preparation of chondrichthyan skeletal specimens and for their useful input and experience. Didier Cot (IEM-Montpellier) for SEM assistance. The Paleontology Department (ISE-M, University of Montpellier) for the opportunity to prepare the *Carcharhinus melanopterus* specimen.

References

- Allis, E.P., 1923: The cranial anatomy of *Chlamydoselachus anguineus*. Acta Zool. 4, 123-221.
- Aschliman, N., 2011: The batoid tree of life: Recovering the patterns and timing of the evolution of skates, rays and allies (Chondrichthyes, Batoidea), PhD dissertation, Florida State University, Tallahassee.
- Cappetta, H., 2012: Chondrichthyes. Mesozoic and Cenozoic Elasmobranchii. In: Handbook of Paleoiichthyology, Vol. 3E: Teeth. Ed: H.P. Schultze. Stuttgart: Verlage F. Pfeil, 512 pp.
- Compagno, L.J.V., 1988: Sharks of the order Carcharhiniformes. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 486 pp.
- Compagno, L.J.V. 1999: Endoskeleton. In: Sharks, Skates and Rays. The biology of elasmobranch fishes Ed: W.C. Hamlett. Johns Hopkins Press, Maryland, pp. 69-92.
- Davidson, A.; Brown, G., 2012: Paraloid B-72: Practical tips for the vertebrate fossil preparatory. Collection Forum 26, 99-119.
- Enault, S.; Cappetta H.; Adnet S., 2013: Simplification of the enameloid microstructure of large stingrays (Chondrichthyes: Myliobatiformes): a functional approach. Zool. J. Linn. Soc. 169: 144-155.
- Hefti, E.; Treschsel, U.; Rufenacht, H.; Fleisch, H., 1980: Use of dermestid beetles for cleaning bones. Calcif. Tissue Int. 31, 45-47.
- Hildebrand, M., 1968: Anatomical preparations. Berkeley: University of California Press, 100 pp.
- Human, B.A.; Morrison, S.M.; MacLeod, I.D., 2012: Is the megamouth shark susceptible to mega-distortion? Investigating the effects of twenty-two years of fixation and preservation on a large specimen of *Megachasma pelagios* (Chondrichthyes: Megachasmidae). Rec. West. Aust. Mus. 27, 7-20.

- Lee, E.J.; Luedke, J.G.; Allison, J.L.; Arber, C.E.; Merriwether D.E.; Steadman D.W., 2010: The effect of different maceration techniques on nuclear DNA amplification using human bone. *J. Forensic Sci.* 55, 1032-1038.
- Maisey, J.G., 2001: Remarks on the inner ear of elasmobranchs and its interpretation from skeletal labyrinth morphology. *J. Morphol.* 250, 236-264.
- Maisey, J.G., 2004: Morphology of the braincase in the broadnose sevengill shark *Notorynchus* (Elasmobranchii, Hexanchiformes), based on CT scanning. *Am. Mus. Novit.* 3429, 1-52.
- Mollen, F.H.; Wintner, S.P.; Iglesias, S.P.; Van Sommeran, S.R.; Jagt, J.W.M., 2012: Comparative morphology of rostral cartilages in extant mackerel sharks (Chondrichthyes, Lamniformes, Lamnidae) using CT scanning. *Zootaxa* 3340, 29-43.
- Nishida, K. 1990. Phylogeny of the suborder Myliobatoidei. *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 37, 1-108.
- Packard, A., 1959: Preparation of skeletons by marine animals. *Tuatara* 7, 120.
- Parker, T.J., 1881: On a new method of preserving cartilaginous skeletons and other soft animal structures. *Trans. Proc. R. Soc. N. Z.* 14, 258-264.
- Pilgrim, B.L.; Franz-Odenaal, T.A, 2009. A comparative study of the ocular skeleton of fossil and modern chondrichthyans. *Journal of Anatomy* 214, 848-858.
- Reynolds, S.H. 1897. *The vertebrate skeleton.* Cambridge University Press
- Sanda, R.; De Maddalena, A., 2003a: Collection of the sharks of the national museum in Prague-Part 1. Complete taxiderms and liquid preservations. *J. Nat. Mus., Natural History Series* 172, 61-70.
- Sanda, R.; De Maddalena, A., 2003b: Collection of the sharks of the national museum in Prague-Part 2. Skeletal preservations *J. Nat. Mus., Natural History Series* 173, 51-58.
- Shimada, K.; Rigsby, C.K.; Kim, S.H., 2009: Labial cartilages in the smalltooth sandtiger shark, *Odontaspis ferox* (Lamniformes: Odontaspidae) and their significance to the phylogeny of lamniform sharks. *Anat. Rec.* 292, 813-817.
- Shirai, S., 1992: *Squalean phylogeny: a new framework of "squaloid" sharks and related taxa.* Hokkaido University Press, Sapporo, Japan, 151 pp.
- Stepanek, R.; Kriwet, J., 2012: Contributions to the skeletal anatomy of freshwater stingrays (Chondrichthyes, Myliobatiformes): 1. Morphology of male *Potamotrygon motoro* from South America. *Zoosyst. Evol.* 88, 145-158.
- Stohler, R., 1945: Preparation of shark chondrocrania for class use. *Science* 102, 403-404.
- Tannheimer, J.F., 1939: A method of preparing cartilage skeletons. *Proc. South Dakota Acad. Sci.* 19: 118-123

Troisième partie .

**Diversité et évolution de la
microstructure dentaire des sélaciens**

9. L'émailloïde des néosélaciens : contexte historique

Les vertébrés sont caractérisés par une grande diversité de structures dentaires d'un point de vue morphologique et fonctionnel. Elles sont une source importante d'information tant pour comprendre des processus physiologiques à l'échelle des organismes que des changements évolutifs à l'échelle des temps géologiques. De ce fait, et compte tenu de leur degré élevé de minéralisation, les dents sont au croisement de nombreuses disciplines scientifiques (Carlson, 1990). Le premier niveau d'étude d'une dent est morphologique dans la mesure où elles sont observables à l'œil nu. D'autres caractéristiques dentaires sont pourtant susceptibles d'être au moins aussi informatives que leur morphologie, notamment leur composition chimique ou la structure des tissus qui les constituent. L'histologie dentaire des mammifères suscite par exemple un intérêt particulier depuis longtemps (Hunter, 1771; Schreger, 1800), leur émail étant généralement caractérisé par une microstructure prismatique (agglomération de cristallites d'hydroxyapatite caractérisées par la même orientation et séparées des autres prismes par un fourreau organique). Cette microstructure est de plus peu altérée par les processus de diagenèse (von Koenigswald et al., 1993). L'organisation de ces prismes au sein de la couche d'émail est susceptible de fournir non seulement des caractères phylogénétiquement informatifs (Rensberger & Königswald, 1980; von Koenigswald, 2004; Tabuce et al., 2007), mais également des informations sur les contraintes fonctionnelles auxquelles sont soumises les dents lors de la prise alimentaire, certaines organisations prismatiques permettant de réduire le risque de fractures ou de limiter l'abrasion de l'émail (von Koenigswald & Rose, 2005; Shimizu et al., 2005; Stefen & Rensberger, 2002).

Compte tenu de l'importance des restes dentaires dans le registre fossile, de nombreux auteurs se sont penchés sur d'autres groupes de vertébrés, et notamment les poissons

9. L'émailloïde des néosélaciens : contexte historique

osseux et cartilagineux. L'étude de l'histologie dentaire de ces derniers remonte principalement aux travaux fondateurs d'Agassiz (1833) et d'Owen (1840) au 19^{ème} siècle. Cependant c'est surtout le 20^{ème} siècle qui voit l'explosion de ce champ disciplinaire, notamment grâce au développement de nouveaux outils techniques et analytiques, en particulier la microscopie électronique.

De nombreux travaux ont suivi ceux d'Agassiz et d'Owen, cherchant dans la plupart des cas à déceler l'intérêt systématique et/ou fonctionnel des tissus dentaires. Des taxons fossiles et actuels ont également souvent été considérés ensembles, dans le but de retracer leurs relations évolutives et de comprendre les processus développementaux à l'origine des tissus dentaires. L'émailloïde a longtemps été considéré comme une forme particulièrement minéralisée de dentine (e.g. Carlson, 1990; Peyer, 1968). De ce fait, la plupart des travaux concernant l'histologie dentaire des chondrichthyens ont d'abord principalement porté sur la dentine en raison de sa plus grande facilité d'observation et de son volume important en comparaison des autres tissus dentaires (e.g. Orvig, 1967; Peyer, 1968). Ces approches ont notamment conduit à la description d'une diversité importante de types de dentine, dont la validité est parfois remise en cause (Radinsky, 1961), et à des hypothèses phylogénétiques invalides (par exemple le groupement des cochliodontes (un groupe de chondrichthyen fossile apparenté aux chimères et possédant des plaques dentaires broyeuses) avec les batomorphes par Thomasset (1930), ou la classification de Glikman (1964), entièrement basée sur l'histologie de la dentine. Si elle doit être appréhendée avec prudence dans la mesure où elle est susceptible de présenter des caractères homoplasiques (Blazejowski, 2004), l'histologie dentaire, et notamment la microstructure de certains tissus, présente un intérêt taxonomique non négligeable dans le cadre de certains groupes de chondrichthyens (Cappetta, 2012; Manzanares et al., 2014; Radinsky, 1961).

C'est notamment le cas des néosélaciens, dont la structure caractéristique de l'émailloïde en « triple couche » décrite par Reif (1973) a longtemps été considérée comme leur unique synapomorphie dentaire. Dans ce contexte, l'émailloïde des néosélaciens (figure 9) est caractérisé par (i) une couche externe, la SLE (*Shiny Layer Enameloid*), composée de cristaux individualisés de fluoroapatite orientés de manière aléatoire, sensée limiter la formation et la propagation de micro-fissures à la surface de la dent. Cette couche particulièrement fine et sensible aux attaques acides est généralement difficile à observer.

9. L'émailloïde des néosélaciens : contexte historique

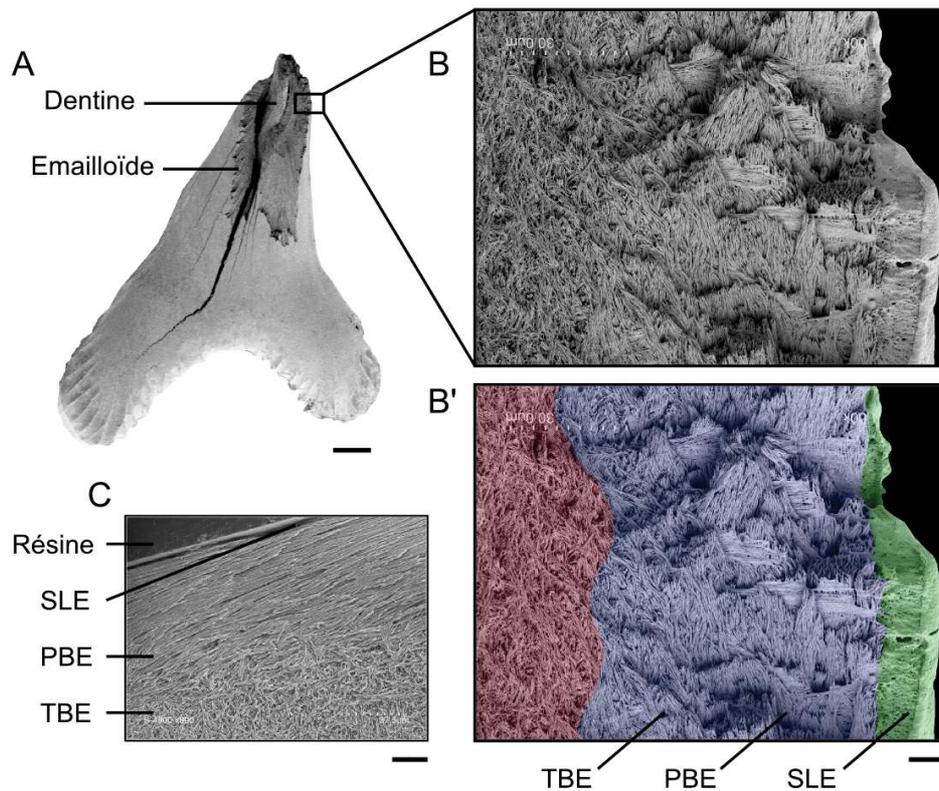


FIGURE 9. – Microstructure en « triple couche » de l'émailloïde des néosélaciens. **A** : dent de grande rousette (*Scyliorhinus stellaris*). Échelle : 0,5 mm. **B-B'** : structure interne de l'émailloïde au niveau d'une cassure de la couronne vue au MEB et en fausses couleurs pour interprétation (B'). Échelle : 10 μ m. **C** : coupe transversale de dent d'*Odontaspis* sp.† au MEB pour visualiser l'orientation des faisceaux de la PBE. Échelle : 20 μ m.

9. L'émailloïde des néosélaciens : contexte historique

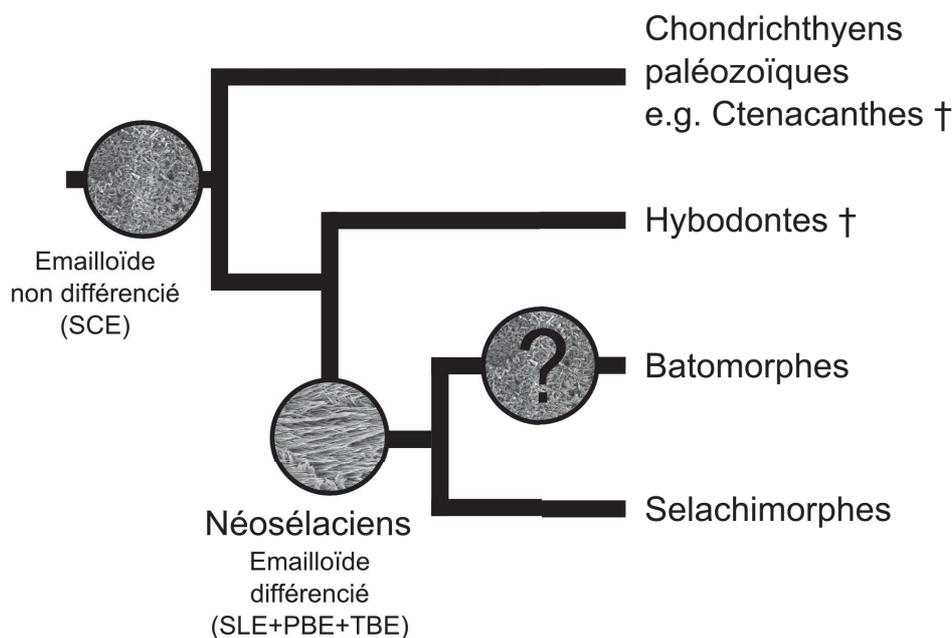


FIGURE 10. – Évolution supposée de la microstructure de l'émailloïde chez les chondrichthyens avant ce travail. Les formes paléozoïques (représentées ici par les cténacanthes) et les hybodontes sont caractérisés par une microstructure non différenciée, une SCE unique. Les néosélaciens possèdent une histologie plus complexe, avec un émailloïde bien différencié, constitué de trois couches distinctes, et considéré comme leur unique synapomorphie dentaire..

(ii) une couche intermédiaire, la PBE (*Parallel Bundled Enameloid*), offrant une résistance aux forces de torsion et dont les cristaux sont arrangés en faisceaux plus ou moins compactés et parallèles à la surface de la couronne et (iii) une couche interne, la TBE (*Tangled Bundled Enameloid*), dont les faisceaux de cristaux forment des paquets moins bien définis et dépourvus d'orientation apparente. La TBE est ainsi sensée permettre la gestion des forces compressives, ce qui est bien illustré par son importance dans les dents de certains taxons durophages comme *Heterodontus* (Gillis & Donoghue, 2007; Thies, 1982). Cette microstructure complexe est utilisée depuis plus de quarante ans comme un outil taxonomique efficace permettant de distinguer dans le registre fossile les dents des premiers néosélaciens de celles des autres élastomobranthes, et notamment celles de leur groupe frère, les hybodontes dont les dents présentent une microstructure non différenciée composée de cristallites isolées et dépourvues d'orientation préférentielle (figure 10). Cette couche unique d'émailloïde est appelée SCE (*Single Crystallite Enameloid*), et considérée comme homologue avec la couche la plus externe de l'émailloïde des néosélaciens, la SLE (Andreev & Cuny, 2012).

La microstructure dentaire des raies a en revanche longtemps été négligée, bien que

9. *L'émailloïde des néosélaciens : contexte historique*

ce groupe constitue aujourd'hui le clade de néosélaciens le plus diversifié avec plus de 600 espèces présentant un large éventail de morphologies, préférences écologiques, et de stratégies trophiques (Compagno, 1990; McEachran & Dunn, 1998). Cette apparente absence d'intérêt pour leur histologie dentaire peut notamment s'expliquer par : i) une apparition tardive dans le registre fossile, au début du Jurassique (Cappetta, 2012; Del-sate & Candoni, 2001) alors que leur divergence avec les sélachimorphes est estimée entre la fin du Permien et le début du Trias en fonction des auteurs et des techniques de datation (Aschliman et al., 2012; Inoue et al., 2010), voire même au Dévonien Heinicke et al. (2009), ce qui est toutefois difficilement conciliable avec les données du registre fossile et ii) des relations phylogénétiques qui sont longtemps restées mal résolues, les considérant notamment comme un groupe de requins très dérivés (Shirai, 1992, 1996). Le peu de données disponibles sur leur histologie dentaire semblait pourtant indiquer que la triple couche d'émailloïde est absente chez les raies (Preschoft et al., 1974; Reif, 1977; Thies, 1982), et la possession d'une couche unique de SCE (Reif, 1977; Cuny et al., 2009) ou de TBE (Gillis & Donoghue, 2007) ce qui a été interprété comme une adaptation à un régime alimentaire principalement durophage (Preschoft et al., 1974; Botella et al., 2009). Si la reconstruction du régime alimentaire de l'ancêtre hypothétique des raies semble effectivement en faveur de la durophagie (Dean et al., 2007), cette hypothèse néglige cependant le fait que les raies occupent les mêmes niches trophiques que les requins, à l'exception de la mégacarnivorie (Dean et al. 2005b).

Cette particularité histologique a été successivement considérée comme un état de caractère plésiomorphe des batoïdes, dans la mesure où les plus anciennes formes échantillonnées dans la littérature, datant du Jurassique moyen (Cuny et al., 2009) présentent déjà un émailloïde non différencié, ou au contraire comme un caractère dérivé secondairement des batoïdes (Underwood, 2006), considérées comme des requins dérivés ayant perdu secondairement la SLE (ou la TBE, selon les auteurs) et la PBE. Cette dernière est finalement considérée par certains auteurs comme une synapomorphie des sélachimorphes uniquement (Cuny & Benton, 1999), ce qui réfute finalement l'utilisation de la « triple couche » d'émailloïde comme unique synapomorphie dentaire des néosélaciens. Dans ce contexte ambigu, la microstructure de l'émailloïde des batomorphes n'a pas fait l'objet de travaux supplémentaires et les caractères microstructuraux décrits plus haut ont continué d'être largement utilisés dans un contexte taxonomique et phylogénétique

9. L'émailloïde des néosélaciens : contexte historique

(Botella et al., 2009; Gillis & Donoghue, 2007; Manzanares et al., 2014).

Un des objectifs de ce travail de thèse a donc été de réaliser l'échantillonnage le plus complet possible au sein des batomorphes, en incluant des formes fossiles et actuelles, afin d'avoir un regard à la fois sur leur diversité actuelle et sur leur histoire évolutive (figure 11). Les données récoltées dans ce contexte incluent 56 taxons représentés par environ 250 coupes et plus de 2500 prises de vues, et représente environ 80% de la diversité familiale des batomorphes, ce qui constitue le plus large échantillonnage de microstructure dentaire réalisé à ce jour chez les chondrichthyens. Seules quelques familles (Narcinidae, Cyclobatidae, Hexatrygonidae, Urolophidae, Urotrygonidae) n'ont pas été échantillonnées, principalement pour des raisons de disponibilité du matériel dentaire. Ces familles ne représentent toutefois pas des clades ou des morphologies singulières, et leur exclusion du jeu de données est considérée ici comme ayant un impact limité, voire minime, sur les résultats obtenus.

Le chapitre suivant est consacré à une description de la diversité de microstructures dentaires existante chez les batomorphes mise en évidence au cours de ce travail. Une partie de ces résultats a été publiée dans le *Zoological Journal of the Linnean Society* (Enault et al., 2015a), accompagné de nouvelles données sur la microstructure dentaire d'autres groupes de chondrichthyens (sélachimorphes, hybodontes et cténacanthes) qui seront également brièvement abordées ici. La publication associée à ces travaux est disponible à la fin de cette partie.

9. L'émailloïde des néosélaciens : contexte historique

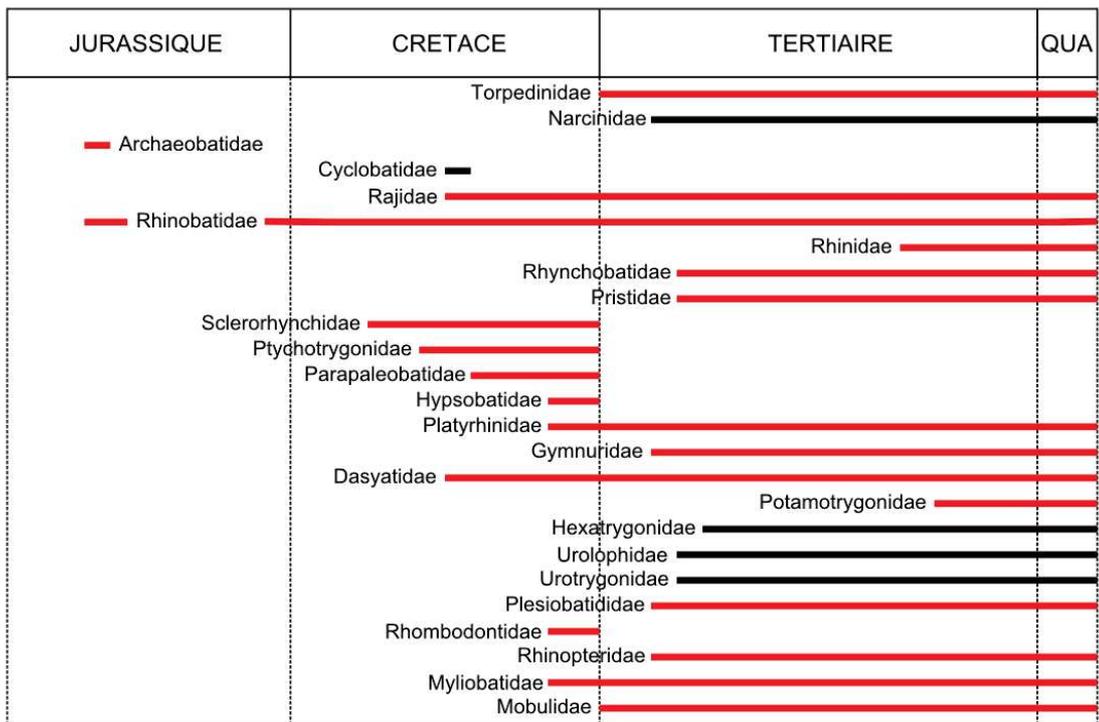


FIGURE 11. – Échantillonnage des familles de batomorphes réalisé dans le cadre de ce travail. Rouge : taxons échantillonnés. Noir : taxons non-échantillonnés. Répartition stratigraphique basée sur Cappetta (2012)

10. Diversité des caractères dentaires microstructuraux des néosélaciens

La réévaluation de la diversité de microstructures dentaires existant chez un large échantillonnage de néosélaciens a d'abord permis une remise à jour de la terminologie associée à la description de ces tissus (figure 12). Ainsi, d'un système basé sur la variation du nombre de « couches » différenciées au sein de l'émailloïde (entre une (taxons non-néosélaciens, batoïdes) et trois (sélachimorphes)) un système légèrement plus complexe est proposé. Celui-ci est basé sur deux unités principales : la SCE, qui regroupe la SCE et la SLE décrite auparavant et qui sont toujours caractérisées par une absence de différenciation et d'organisation, et la BCE (*Bundled Crystallite Enameloid*). Cette dernière regroupe trois unités distinctes : les PBE et TBE précédemment décrites, et la RBE (*Radial Bundled Enameloid*), permettant de décrire les faisceaux radiaux de cristallites (orientés perpendiculairement à la surface de la dent) plus ou moins bien définis et présentant des morphologies apparemment très variables, mais présents chez la plupart des groupes discutés ici (sélachimorphes, batomorphes, hybodontes, mais absents chez les cténacanthes). Si la combinaison de tous les éléments de cette morphologie ne semblent se retrouver que chez les sélachimorphes, elle permet toutefois de décrire l'ensemble de la variation de microstructures dentaires rencontrées chez les élasmobranches.

10.1. Néosélaciens

Les résultats de microstructure dentaire obtenus chez les batoïdes révèlent une diversité bien plus importante que ne le laissent supposer les rares descriptions existant dans la littérature (e.g. Cuny et al., 2009; Preschoft et al., 1974; Thies, 1982) et que ce qui est actuellement connu chez les sélachimorphes. Cette diversité de morphologies remet en

10. Diversité des caractères dentaires microstructuraux des néosélaciens

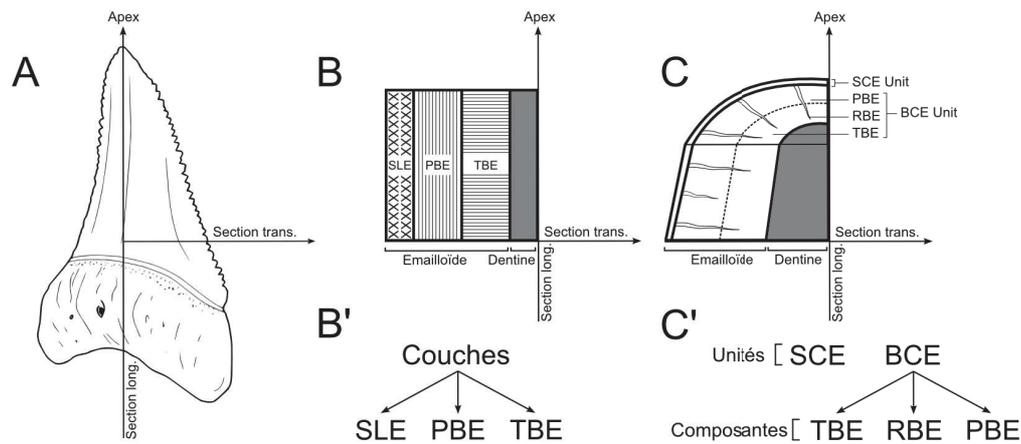


FIGURE 12. – Évolution de la compréhension de la microstructure dentaire des néosélaciens. **A** : dent de *Carcharodon carcharias* illustrant les plans de coupe utilisés. **B-B'** : conception schématique de la structuration de l'émailloïde des néosélaciens depuis les travaux de Reif (1973). **C-C'** : conception actuelle, basée sur un plus large échantillonnage de taxons, notamment de batomorphes. Modifié d'après Enault et al. (2013; 2015a).

question non seulement certaines observations effectuées préalablement sur des taxons isolés, mais également les hypothèses concernant l'évolution des tissus hyperminéralisés chez les chondrichthyens. Les taxons de batoïdes décrits dans Enault et al. (2015a) (quatre rajiformes et deux myliobatiformes, qui constituent les deux ordres de batoïdes les plus diversifiés), ont été sélectionnés car ils sont représentatifs du spectre de variation morphologique observable dans l'émailloïde des raies.

Le plus vieux taxon figuré ici, *Belemnobatis* sp., un rhinobatoïde du Crétacé inférieur, possède une microstructure complexe et différenciée, avec des cristallites regroupées en faisceaux courts et mal individualisés (Enault et al., 2015a, figure 5-F,G). Cette morphologie, nettement moins structurée que ce qui est observable chez les sélachimorphes, est toutefois très différente, et en contradiction, avec des résultats obtenus par Cuny et al. (2009, figure 7) sur *Belemnobatis aominensis*, qui présente une SCE classique et non différenciée. Les différences morphologiques importantes existant entre ces deux taxons suggèrent l'existence d'une diversité importante de microstructure dentaire chez les genres ayant une longue répartition stratigraphique. Cette hypothèse est également soutenue par des résultats obtenus chez les sélachimorphes avec *Synechodus* et *Paraorthacodus* par exemple (Guinot & Cappetta, 2011). *Pytchotrygon* sp. et *Parapalaeobates* cf. *atlanticus*, deux autres Rajiformes du Crétacé supérieur présentent un émailloïde épais dont la microstructure est beaucoup plus complexe et mieux structurée. Chez ces

10. Diversité des caractères dentaires microstructuraux des néosélaciens

taxons, c'est la RBE qui est la plus développée. La SCE, au niveau de la partie la plus externe de la couche d'émailloïde, est également bien visible (Enault et al., 2015a, figure 5-H-L). La présence éventuelle de la PBE n'est pas clairement établie, bien que des faisceaux apparemment parallèles à la surface occlusale, et complètement inclus dans la RBE soient observables.

Au contraire, *Hypsobatis weileri*, un rajiforme datant également du Crétacé présente une histologie dentaire non différenciée (Enault et al., 2015a, figure 5-A, B), très différente de celle des autres taxons de Rajiformes examinés, et conforme aux descriptions de la microstructure dentaire des batoïdes existant dans la littérature (e.g. Cuny et al., 2009; Preschoft et al., 1974; Thies, 1982). Ce type de microstructure, également rencontré chez d'autres familles de Rajiformes, non figurées dans cette publication, illustre la diversité importante existant au sein de cet ordre.

Les Myliobatiformes, qui regroupent les taxons les plus spécialisés d'un point de vue écologique, sont représentés ici par *Rhombodus binckhorsti*, une raie durophage du Crétacé supérieur et *Leidybatis jugosus*, un taxon de l'Éocène. L'histologie dentaire de ces taxons est cohérente avec celle de tous les Myliobatiformes échantillonnés au cours de ce travail, qui présentent systématiquement un émailloïde très simple, non différencié et dépourvu de faisceaux ou de cristallites présentant une orientation préférentielle (SCE) (Enault et al., 2015a, figure 5-C-E). Cette particularité sera discutée dans un contexte fonctionnel dans le chapitre 12.

Le plus gros effort d'échantillonnage a donc été réalisé chez les Rajiformes et les Myliobatiformes, ces deux ordres présentant la diversité spécifique la plus importante. En ce qui concerne les Torpediniformes, le matériel dentaire provient dans son intégralité de l'espèce *Torpedo marmorata*. Ces dents présentent un émailloïde non différencié de type SCE, bien que l'observation de leur histologie dentaire aie été rendue difficile à cause de résidus de matière organique dans les dents, qui limitent l'observation détaillée de la structure cristalline de l'émailloïde. L'observation du matériel dentaire actuel dans son ensemble s'est ainsi révélée particulièrement difficile, malgré l'application de différents protocoles visant à éliminer la trame organique des dents et qui sont détaillés dans Enault et al. (2013). Ces protocoles, incluant entre autres des traitements de durée variable à l'eau de javel, au peroxyde d'hydrogène ou à l'hydroxyde de potassium n'ont pas toujours permis d'obtenir des résultats satisfaisants. Le type de microstructure observé chez

10. Diversité des caractères dentaires microstructuraux des néosélaciens

Torpedo est donc difficile à interpréter, et nécessitera un échantillonnage plus poussé des Torpédiniformes pour être confirmé.

Comme mentionné précédemment, la microstructure dentaire des sélachimorphes est bien mieux documentée que celle des batoïdes. Chez les requins, l'acquisition d'une microstructure complexe est séquentielle dans l'histoire du groupe et l'émailloïde des formes les plus anciennes est peu différencié (Andreev & Cuny, 2012). La microstructure dentaire des sélachimorphes a également tendance à se complexifier le long de l'axe apico-basal de la dent, et l'ensemble des composantes de la microstructure apparaissent plus développées au niveau de l'apex de la dent (Cuny & Risnes, 2005; Guinot & Cappetta, 2011). Les tranchants et les ornements, présentes à la surface des dents de nombreuses espèces, présentent également une variation importante de la microstructure et peuvent être formées entièrement de SCE ou bien par des replis de la BCE, voire par une combinaison des deux comme chez *Rhomphaiodon minor* (Cuny & Risnes, 2005). Les formes les plus récentes sont toutes caractérisées par une association caractéristique d'une SCE très réduite, composée de cristallites sans orientation préférentielle, et d'une BCE, organisée en faisceaux. Celle-ci est généralement formée par trois composantes : la PBE, où les faisceaux de cristallites sont alignés parallèlement à la surface de la couronne mais changent d'orientation au niveau des tranchants, la TBE en position interne et la RBE, dont les structures radiales peuvent également former des faisceaux très denses. La seule exception notable est constituée par les dents latérales broyeuses du genre *Heterodontus*, chez qui la PBE est absente, tandis que la microstructure des dents antérieures, cuspidées et de type agrippeur, présentent la morphologie classique rencontrée chez les autres sélachimorphes (Reif, 1973).

10.2. Hybodontes et cténacanthes

Bien que l'échantillonnage réalisé dans le cadre de cette thèse se limite aux néosélaciens, la publication d'une partie de ces résultats constituait également une opportunité d'y adjoindre de nouvelles données concernant des taxons non-néosélaciens. Ces données sont issues de la réévaluation de la microstructure dentaire de certains hybodontes, qui constituent pourtant le groupe le mieux étudié avec les sélachimorphes en termes d'histologie dentaire, et de la description de structures totalement inattendues chez un cténacanth.

10. Diversité des caractères dentaires microstructuraux des néosélaciens

Ces résultats sont brièvement abordés pour permettre de replacer les données microstructurales obtenues chez les néosélaciens dans le contexte plus large de l'évolution de la microstructure dentaire chez les chondrichthyens.

Traditionnellement l'émailloïde des hybodontes a été considéré comme non différencié, composé uniquement de SCE. La description par Cuny et al. (2001) d'hybodontes possédant un émailloïde plus complexe a permis de rompre avec cette conception. Nos données ont permis de mettre en évidence une diversité de microstructures plus importante que ce qui était attendu, en particulier chez des formes possédant une morphologie dentaire de type broyeur. Ces taxons présentent non seulement une SCE externe, mais également une BCE composée de faisceaux de cristallites courts et compacts, présentant une orientation préférentielle perpendiculaire à la surface de la couronne. Cette organisation est mieux visible chez les taxons possédant des dents de grande taille (*Asteracanthus*, *Acrodus*) que chez ceux possédant des dents de taille plus réduite, chez qui les faisceaux de la BCE sont moins bien définis. Il est intéressant de noter que ces observations vont à l'inverse de l'hypothèse initiale formulée vis-à-vis de l'absence de différenciation de l'émailloïde des raies, simplification interprétée comme résultant d'un régime broyeur.

Les données concernant l'histologie dentaire des cténacanthes demeurent extrêmement partielles en comparaison des hybodontes et des sélachimorphes. Leur microstructure dentaire, auparavant interprétée comme une SCE unique (Gillis & Donoghue, 2007) fait finalement preuve d'une variabilité importante. *Glikmanius* cf. *myachkovensis*, un cténacante datant du Permien possède une SCE homogène, dont les cristallites sont de taille très réduite et étroitement compactées au sein du tissu (Enault et al., 2015a). Cependant, la description d'une microstructure complexe, très réminiscente de celle des sélachimorphes a été décrite récemment dans l'émailloïde de *Neosaiodus flagstaffensis*, un autre cténacante du Permien (Guinot et al., 2013). Chez ce taxon, la PBE, jusque-là jamais documentée en dehors des sélachimorphes, est clairement visible. La morphologie très particulière des dents de *Neosaiodus*, de type cladodonte, proscrit également une erreur de détermination. En revanche, aucune RBE ni TBE n'ont encore pu être mises en évidence chez les cténacantes examinés.

Il est maintenant possible de revenir sur la figure 10 en y incluant les données obtenues au cours de ce travail. Les néosélaciens sont toujours caractérisés par un émailloïde présentant une microstructure complexe, bien que celle-ci varie de manière importante au

10. Diversité des caractères dentaires microstructuraux des néosélaciens

sein du groupe. Très stable chez les sélachimorphes (à l'exception apparemment unique des dents broyeuses latérales d'*Heterodontus*) où elle présente systématiquement tous les éléments décrits auparavant (une SCE externe, recouvrant une BCE composée de PBE, RBE et TBE), la microstructure dentaire est beaucoup plus variable chez les batomorphes, chez qui ces éléments sont également présents, mais jamais réunis simultanément chez un même taxon. Les sclérorhynchiformes, un groupe de poissons-scies du Crétacé représentent toutefois un cas particulier, et seront abordés dans le chapitre 11. Au sein des batoïdes, seuls les Myliobatiformes semblent caractérisés par une microstructure dentaire très stable, totalement dépourvue d'organisation, ce qui dans leur cas semble être une morphologie dérivée indépendamment des groupes paléozoïques présentant ce type d'organisation. Chez les hybodontes présentant une BCE, seules la TBE et la RBE ont pu être mis en évidence, ce qui correspond à la situation existant chez les batoïdes.

Dans l'ensemble, si les mêmes composantes sont présentes chez les hybodontes et les batoïdes, ce sont ces dernières qui présentent les morphologies les plus complexes. Les cténacanthes discutés ici présentent deux types de microstructures radicalement différentes : une SLE unique (*Glikmanius*) ou une BCE apparemment composée uniquement de PBE (*Neosaivodus*). Dans ce contexte, la description d'une PBE, considérée jusque-là comme la seule véritable synapomorphie dentaire des sélachimorphes (Cuny & Benton, 1999) indique non seulement que cette structure ne peut plus être considérée comme synapomorphie des sélachimorphes, mais également qu'elle est susceptible d'avoir une répartition plus large dans la phylogénie des chondrichthyens que ce qui est connu actuellement. Il n'est donc pas à exclure que d'autres groupes de chondrichthyens paléozoïques réservent également quelques surprises après un échantillonnage plus exhaustif. Cela dit, pour cette raison, ce sont plutôt les observations réalisées chez les hybodontes qui serviront à polariser les caractères microstructuraux des néosélaciens dans ce travail. Ainsi, si la microstructure dentaire des Myliobatiformes apparaît comme dérivée au sein des batoïdes, celle de la plupart des Rajiformes, présentant une association SCE/BCE plus ou moins complexe est une plésiomorphie pour le groupe, les hybodontes présentant déjà ce type d'association, ce qui soutient l'hypothèse de Cuny et al. (2009).

Les facteurs exerçant une influence sur l'évolution de la microstructure dentaire sont encore mal définis, mais les résultats issus de cette publication suggèrent une relation

10. Diversité des caractères dentaires microstructuraux des néosélaciens

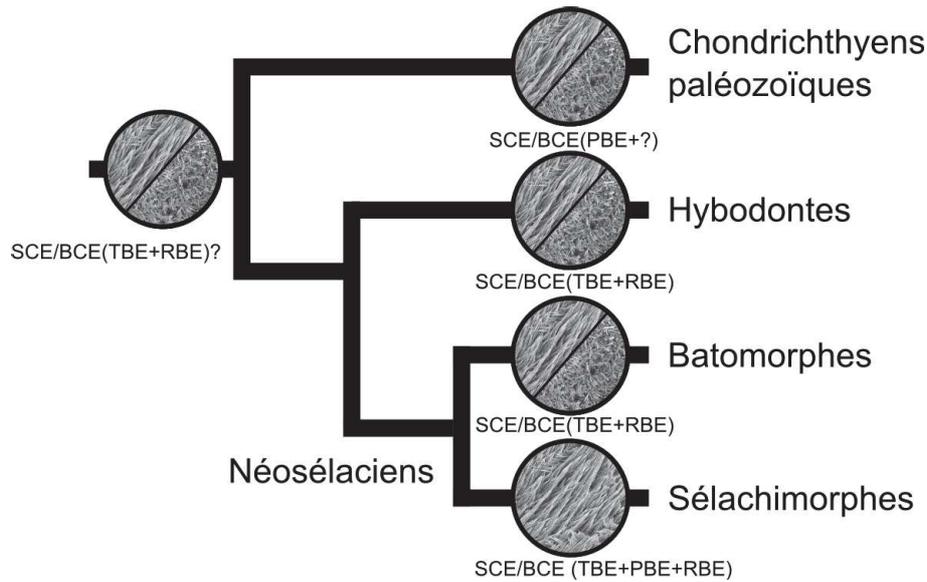


FIGURE 13. – Réévaluation de l'évolution de la microstructure de l'émailloïde chez les chondrichthyens. Dans leur ensemble, la microstructure dentaire des batoïdes est plus réminiscente de celle des hybodontes que de celle des sélachimorphes, ce qui est interprété comme une organisation plésiomorphique pour les néosélaciens.

entre la microstructure et la morphologie dentaire. Chez les taxons possédant des dents à couronne haute et une morphologie de type coupeur ou arracheur (voir Cappetta (1986)), la BCE présente en général des faisceaux orientés parallèlement à la surface de la couronne (composante PBE). Cette organisation est dans la plupart des cas liée à une réduction importante de la SCE, et une organisation très similaire est observable chez les actinoptérygiens possédant une dentition de type coupeur, comme chez certains Characiformes et Perciformes, ce qui a été interprété comme un phénomène de convergence (Reif, 1979). Cependant, les dents de type broyeur d'hybodontes et de batomorphes présentent souvent des microstructures assez distinctes ; avec des faisceaux bien définis chez les premiers, tandis que les seconds possèdent une microstructure non différenciée (SCE), ce qui indique clairement que la morphologie dentaire n'est pas l'unique facteur impactant la microstructure dentaire. Plusieurs hypothèses (Gillis & Donoghue, 2007; Preschoft et al., 1974) suggèrent qu'il s'agisse au moins en partie de caractères adaptatifs associés à des types écologiques, ce qui sera développé dans le chapitre 12.

11. Microstructure des Sclérorhynchiformes

Les sclérorhynchiformes forment un groupe monophylétique de batoïdes fossiles connus uniquement au Crétacé et atteignant une taille d'environ un mètre de long (Cappetta, 1974, 2012; Kriwet, 2004; Wueringer et al., 2009). Ils sont caractérisés par une morphologie assez similaire à celle des pristidés (poissons-scies actuels) et des pristiophoridés (requins-scies), avec un corps fuselé et un rostre allongé (scie rostrale) portant des denticules dermiques de grande taille disposés sur ses bords (denticules rostraux) (figure 14). L'évolution d'une scie rostrale s'est produite de manière indépendante chez ces trois taxons, et il a été démontré qu'ils ne forment pas un groupe monophylétique (Cappetta, 1974, 1980). Les sclérorhynchiformes et les pristidés sont dérivés indépendamment des rhinobatoïdes, ce qui est attesté par des différences importantes dans la morphologie squelettique de leurs rostres et de leurs nageoires pectorales, contrairement à certaines hypothèses suggérant que les pristidés puissent avoir évolué à partir de certains sclérorhynchidés (Arambourg, 1940; Schaeffer, 1963).

La morphologie générale de la scie rostrale est assez semblable chez ces groupes, ce qui permet d'inférer que les sclérorhynchiformes s'en servaient probablement d'une manière similaire à leurs analogues actuels, pour détecter des proies dans le sédiment et neutraliser celles-ci (Cappetta, 2012; Schaeffer, 1963; Wueringer et al., 2012). Plusieurs différences anatomiques permettent toutefois de les différencier : les denticules rostraux des sclérorhynchiformes, très variables morphologiquement, étaient renouvelés pendant la vie de l'animal, et étaient rattachés à la scie rostrale par des ligaments (Pereira & Medeiros, 2008; Schaeffer, 1963; Slaughter & Springer, 1968). Les denticules rostraux des pristiophoridés sont très semblables à ceux des sclérorhynchidés dans leur renouvellement et leur attachement à la scie rostrale. Ils se développent dans l'axe de celle-ci avant de subir une rotation qui permet de les redresser en position fonctionnelle (Welten et al., 2015). Chez les pristiophoridés des denticules de grande taille sont disposés en alternance

11. Microstructure des Sclérorhynchiformes

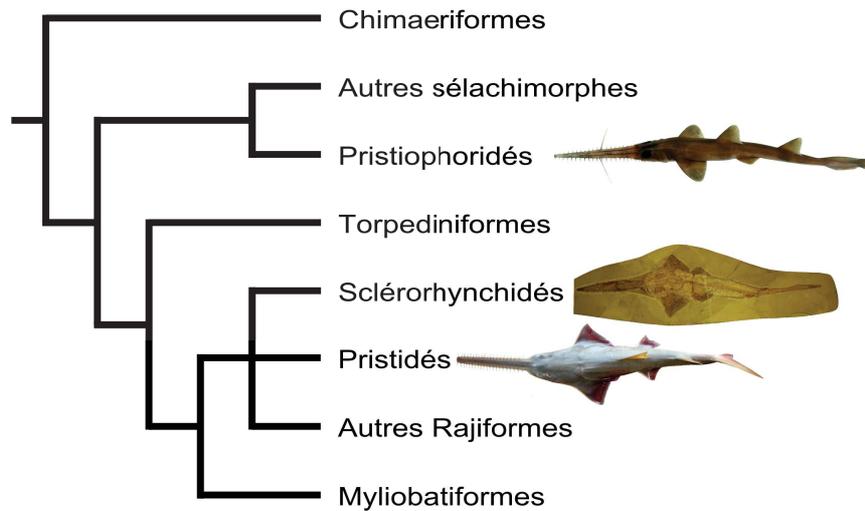


FIGURE 14. – Cladogramme des chondrichthyens illustrant la position des néosélaciens possédant une scie rostrale : pristiophoridés (photo K. Graham), sclérorhynchidés (photo G. Ghedo) et pristidés (photo M. Gruber)

avec plusieurs denticules rostraux de petite taille le long de la scie rostrale (Compagno & Last, 1999). De plus, la cavité pulpaire de leurs dents rostrales est toujours ouverte, alors qu'elle est fermée chez les sclérorhynchidés. En revanche les denticules rostraux des pristidés sont très différents : leur croissance est continue et ils sont implantés dans une alvéole directement dans le rostre. De ce fait, l'émailloïde des denticules rostraux est très rapidement perdu dès qu'ils deviennent fonctionnels. Ils ne sont pas renouvelés, et en cas de perte accidentelle, l'alvéole est comblée par du tissu cicatriciel (Schaeffer, 1963). Des gisements libanais ont livré quelques squelettes complets de sclérorhynchiformes dans un état de conservation exceptionnel, permettant une meilleure compréhension de leur anatomie squelettique, mais également de disposer de denticules rostraux et de dents orales en association (Cappetta, 1980). Dans la plupart des cas cependant, les denticules rostraux et les dents orales sont retrouvés de manière isolée, ce qui peut compliquer leur identification si plusieurs taxons sont présents sur un même gisement (Cappetta, 2012). En raison de leur taille importante en comparaison des dents orales, la description de la plupart des espèces est basée sur les denticules rostraux.

Les sclérorhynchiformes sont divisés en deux groupes sur la base de leur type de dentine : les dents et les denticules rostraux du premier groupe (*Ankistrohynchus*, *Borodinopristis*, *Ctenopristis*, *Dalpazia*, *Ganopristis*, *Ischyrhiza*, *Libanopristis*, *Marckgrafia*, *Micropristis*, *Onchopristis*, *Plicatopristis*, *Sclerorhynchus*) sont constitués d'orthodentine, alors que ceux du second groupe (*Onchosaurus*, *Pucapristis*, *Schizorhiza*) sont constitués d'ostéo-

11. Microstructure des Sclérorhynchiformes

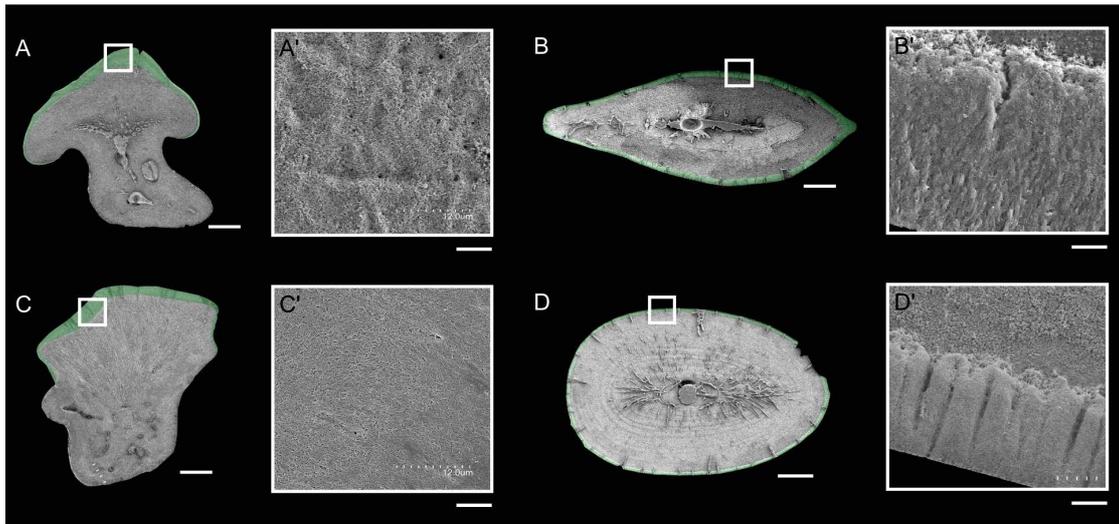


FIGURE 15. – Microstructure de l'émailloïde de *Ctenopristis* et *Ganopristis*. **A-B'** : *Ctenopristis* sp. **A** : dent orale en coupe longitudinale, avec la couche d'émailloïde colorée en vert. Échelle : 200 µm. **A'** : Détail de la SCE. Échelle : 6 µm. **B** : denticule rostral en coupe transversale, avec la couche d'émailloïde colorée en vert. Échelle : 200 µm. **B'** : Détail de la SCE d'un denticule rostral. Échelle : 8 µm. **C-D'** : *Ganopristis leptodon*. **C** : dent orale en coupe longitudinale, avec la couche d'émailloïde colorée en vert. Échelle : 375 µm. **C'** : détail de la SCE. Échelle : 6 µm. **D** : denticule rostral en coupe transversale, avec la couche d'émailloïde colorée en vert. Échelle : 300 µm. **D'** : détail de la SCE d'un denticule rostral. Échelle : 8 µm.

dentine (Cappetta, 2012). La signification fonctionnelle et systématique de cette particularité est mal comprise, mais le choix de la dentine comme outil taxonomique semble peu pertinent (e.g. Radinsky, 1961), et elle est connue pour varier au sein d'un même genre, comme chez *Hemipristis* (Cappetta, 2012). De plus, la microstructure de l'émailloïde chez ces formes n'est pas décrite et leur position phylogénétique est mal résolue. L'analyse cladistique de Kriwet (2004) en fait un groupe frère de tous les autres batoïdes, mais les nœuds faiblement soutenus et la résolution limitée de sa phylogénie ne permettent pas de réellement statuer sur cette question. Afin de vérifier si la microstructure de l'émailloïde était susceptible d'apporter des éléments de réponse à cette question, les denticules rostraux et les dents orales de quatre genres de sclérorhynchiformes représentant les deux groupes présentés précédemment ont été échantillonnés et sont décrits dans les sections suivantes.

11.1. Morphologie

Groupe 1

11. Microstructure des Sclérorhynchiformes

***Ctenopristis* sp. :** Les dents orales de *Ctenopristis* présentent une cuspidé principale bien développée bien qu'elle soit de taille réduite sur les dents examinées (figure 15-A), ce qui est possiblement dû à l'usure de la dent. En section longitudinale, les dents orales examinées présentent une fine couche d'émailloïde non différencié (SCE), recouvrant l'orthodentine (figure 15-A'). Son épaisseur est relativement constante, atteignant son maximum (90 μm) au niveau de l'apex de la cuspidé (carène transverse) et de l'arête centrale. Son épaisseur diminue ensuite très rapidement le long de la couronne. La jonction émailloïde-dentine (EDJ) est mal définie, et il est difficile de voir si des tubules de dentine sont présents, ce qui semble dû à un artefact de préparation.

Les denticules rostraux sont très allongés et recouverts par une fine couche d'émailloïde dépourvue d'ornementation. Les sections transversales montrent que son épaisseur est constante (environ 45 μm), sauf sur les tranchants, au niveau desquels la couche d'émailloïde est beaucoup plus épaisse (environ 120 μm) (figure 15-B). La microstructure de l'émailloïde est similaire à celle des dents orales avec une SCE unique (figure 15-B'). Certaines cristallites présentent une orientation superficielle perpendiculaire à la surface occlusale de la dent, sans toutefois former de faisceaux bien définis.

***Ganopristis leptodon* :** Les dents orales du genre *Ganopristis* sont cuspidées, bien que les cuspidés soient peu marquées sur les dents examinées, ce qui est probablement dû aux mêmes raisons que dans le cas de *Ctenopristis*. Les coupes longitudinales révèlent une couronne principalement constituée d'orthodentine, recouverte par une fine couche d'émailloïde qui présente une épaisseur relativement constante au niveau de la surface occlusale de la dent, environ 180 μm et diminue très rapidement le long de de la couronne (figure 15-C). La microstructure de l'émailloïde est formée par une seule unité de SCE, constituée par des cristallites ne présentant pas d'orientation préférentielle (figure 15-C'). Les cristallites sont compactées de manière plus importante dans la partie la plus profonde du tissu, près de l'EDJ, et la transition vers la structure plus lâche du tissu à la surface de la couronne se fait de manière très graduelle. L'EDJ est mal définie, et des tubules de dentine sont visibles et se prolongent dans la couche d'émailloïde.

Les denticules rostraux ont été sectionnées transversalement. Ces coupes mettent en évidence une épaisseur très importante de dentine, recouverte par une couche d'émailloïde très réduite, mesurant environ 35 μm d'épaisseur (figure 15-D). Celle-ci présente des

11. Microstructure des Sclérorhynchiformes

ornementations peu importantes dans la région des tranchants, eux aussi très peu marqués, et de nombreuses microfractures s'étendant jusque dans la dentine sous-jacente. La couche d'émailloïde des denticules rostraux est constituée par une unité très compacte de SCE (figure 15-D'). Comme dans les dents orales, aucune organisation en faisceaux n'est discernable, mais l'EDJ est mieux définie dans les denticules rostraux que dans les dents orales.

Groupe 2

Pucapristis branisi : Les dents orales sont bien cuspidées, et la couronne est constituée d'orthodentine, recouverte par un émailloïde d'épaisseur variable. Celui-ci est principalement associé à la cuspide (où il atteint 180 µm) avant de diminuer très rapidement le long de la couronne, en particulier sur la face labiale (figure 16-A). Sa microstructure complexe est extrêmement similaire à la microstructure caractéristique des sélachimorphes. Il est en effet constitué par deux unités : une SCE extrêmement réduite et qui n'est pas visible partout à la surface de la couronne, ce qui est vraisemblablement un artéfact de préparation, et la BCE, bien développée qui présente une épaisseur relativement importante (figure 16-A'). Les deux autres composantes, la TBE et la RBE sont plus difficiles à observer et semblent restreintes à la partie la plus superficielle des ornements de la face occlusale (figure 16-A''). L'EDJ est bien définie, et ne contient pas de tubules de dentine.

Les denticules rostraux, de taille importante, ont été sectionnés transversalement. La couche d'émailloïde est bien visible et son épaisseur est particulièrement importante au niveau des tranchants (environ 350 µm) (figure 16-B). La SCE est visible à la surface de certaines zones de la couronne et la BCE est bien visible et très développée. La PBE est beaucoup plus réduite que dans les dents orales, et ne semble pas caractérisée par une orientation aussi strictement parallèle à la surface de la couronne que dans ces dernières (figure 16-B'), ce qui devrait toutefois être vérifié en section longitudinale. La TBE semble limitée à la partie interne des tranchants, ce qui est cohérent avec les observations effectuées dans les dents orales (figure 16-B'') et l'EDJ est ici aussi très bien définie et dépourvue de tubules de dentine.

11. Microstructure des Sclérorhynchiformes

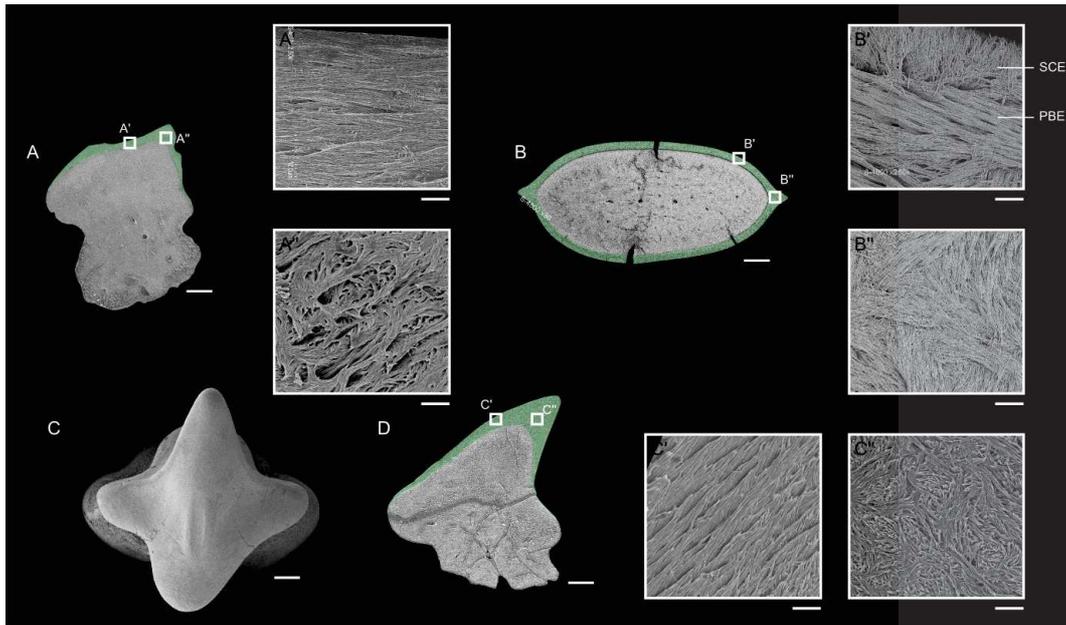


FIGURE 16. – Microstructure de l'émailloïde de *Pucapristis* et *Onchosaurus*. **A-B''** : *Pucapristis branisi*. **A** : dent orale en coupe longitudinale, avec la couche d'émailloïde colorée en vert. Échelle : 250 μm . **A'** : détail de la PBE. **A''** : détail de la TBE. Échelle : 6 μm . **B** : détail de la PBE et de la SCE d'un denticule rostral. **B'** : détail de la TBE. Échelle : 8 μm . **B''** : denticule rostral en coupe transversale, avec la couche d'émailloïde colorée en vert. Échelle : 500 μm . **C-D** : cf. *Onchosaurus* sp. **C** : morphologie générale de la dent en vue apicale. Échelle : 400 μm . **D** : dent orale en coupe longitudinale, avec la couche d'émailloïde colorée en vert. Échelle : 280 μm . **C'** : détail de la PBE. **C''** : détail de la TBE. Échelle : 8 μm .

***Onchosaurus* sp.** : Ce genre est uniquement décrit par des denticules rostraux, qui n'ont pas été examinés ici. Cependant, une dent orale, appartenant probablement à *Onchosaurus* a été échantillonnée dans le cadre de ce travail (figure 16-C). La dent est de petite taille, environ 2,5 mm de large et 3 mm de haut. La carène transverse est bien marquée et la cuspidé est légèrement projetée en direction linguale. La face labiale est convexe dépourvue d'ornementation, et la visière linguale est très développée et arrondie à son extrémité. La face linguale est légèrement concave, également dépourvue d'ornementations et la visière linguale, peu développée, est légèrement projetée au dessus de la racine. Celle-ci est bien développée et elle est plus large que la couronne. Le sillon nutritif est large et modérément profond, et le foramen central est légèrement en position linguale. En section longitudinale, l'EDJ est bien marquée. L'émailloïde recouvre l'ensemble de la couronne et il est particulièrement épais au niveau de la crête transverse, où il atteint 550 μm , puis son épaisseur diminue progressivement vers la base de la couronne et il ne recouvre que partiellement les visières labiales et linguales (figure 16-D). Aucune SCE n'est observable, ce qui est vraisemblablement un artéfact, fréquent avec

11. Microstructure des Sclérorhynchiformes

les dents de sélachimorphes, mais la BCE est bien développée avec deux composantes bien visibles : la PBE, principalement présente sur les bords de la couronne (figure 16-C') et la TBE, bien développée au niveau de la cuspidé (figure 16-C''). La RBE n'est pas discernable sur l'unique spécimen sectionné.

11.2. Discussion

Une variation aussi importante de la microstructure dentaire, au sein de formes supposées proches est inattendue, et les sclérorhynchiformes sont le seul taxon chez qui il a été possible de mettre en évidence avec certitude une PBE bien différenciée, plus réminiscente de l'organisation typique des sélachimorphes que tout autre taxon de batomorphe échantillonné dans ce travail. Si des variations mineures sont observables, potentiellement imputables à la réalisation des coupes, la morphologie générale de la microstructure est similaire entre les dents orales et les denticules rostraux d'un taxon donné, ce qui est congruent avec les données développementales de ces structures (Debiais-Thibaud et al., 2011; Welten et al., 2015). Les taxons appartenant au premier groupe (*Ctenopristis*, *Ganopristis*) sont caractérisés par la présence d'orthodentine et par une microstructure non différenciée, comparable à ce qui est observable chez les Myliobatiformes et chez certains Rajiformes. Au contraire, les taxons appartenant au second groupe (*Pucapristis*, *Onchosaurus*) sont tous deux caractérisés par la présence d'ostéodentine et par un émailloïde complexe et bien différencié. Il est surprenant de noter que c'est la tendance inverse qui est observable chez les autres batoïdes : les Myliobatiformes possèdent une SCE et sont généralement caractérisés par de l'ostéodentine, alors que les Rajiformes, caractérisés par une microstructure beaucoup moins constante mais pouvant être bien différenciée possèdent en général des dents faites d'orthodentine. Un échantillonnage plus large au sein des sclérorhynchiformes permettrait de vérifier la tendance de cette association dentine-microstructure de l'émailloïde chez les autres genres connus. Dans tous les cas ces résultats indiquent une corrélation entre la morphologie de la dentine et la microstructure de l'émailloïde.

La conclusion la plus évidente au vu de ces résultats consisterait à émettre l'hypothèse que certains sclérorhynchidés puissent en réalité être des sélachiformes, qui possèdent aussi ces deux types de dentine (Moyer et al., 2015), une hypothèse qui n'est cependant

11. *Microstructure des Sclérorhynchiformes*

pas soutenue par les caractères dentaires et squelettiques, mais qui n'exclu en revanche pas que les sclérorhynchiformes puissent constituer un groupe paraphylétique. Ces résultats posent également la question de l'appartenance de certains taxons aux affinités incertaines, et regroupés avec les sélachimorphes sur la base de l'existence d'une PBE bien développée (e.g. *Cretomanta*; Enault et al., 2013). Cette observation est également en faveur d'une distribution plus large de ce type de structure dans la phylogénie des chondrichthyens que ce qui était jusqu'alors supposé, ce qui est également suggéré par la description récente d'une PBE dans l'émailloïde d'un cténacanthé (Guinot et al., 2014).

12. Évaluation des hypothèses adaptatives

L'organisation en « triple couche » de l'émailloïde des sélachimorphes a souvent été interprétée dans un contexte adaptatif (Gillis & Donoghue, 2007; Preschoft et al., 1974; Reif, 1977; Thies, 1982). Dans le cadre conceptuel développé par Reif (1973), et avant la description d'un émailloïde différencié chez des taxons non-néosélaciens (e.g. Guinot et al., 2013; Enault et al., 2015a), il a été suggéré que l'évolution rapide d'un émailloïde différencié, structuré en trois composantes distinctes chez les néosélaciens à partir d'un émailloïde monocouche de type SCE, constitue une innovation clé à l'origine de nouvelles stratégies trophiques (Gillis & Donoghue, 2007). Ces stratégies alimentaires impliquent la morsure, secousse et/ou découpe de proies de taille importante plutôt que son ingestion d'une seule pièce, ce qui serait notamment permis par l'orientation préférentielle des cristallites de la PBE, censée offrir une meilleure résistance aux forces de torsion engendrées par ce type de comportement. Elles sont également principalement liées à des types dentaires coupeurs et arracheurs, peu présents avant la radiation des néosélaciens. La relative rareté de ces types dentaires avant l'apparition des néosélaciens peut cependant être liée à des spécialisations écologiques plutôt qu'à des limitations fonctionnelles. Les rares données initialement disponibles sur la microstructure dentaire atypique des batoïdes ont également été interprétées dans un contexte adaptatif, justifié par un régime alimentaire considéré comme étant principalement durophage. Cette interprétation occulte en réalité la différence importante de préférences trophiques existant chez ce groupe. Cette interprétation de leur microstructure dentaire, basée sur un échantillonnage virtuellement inexistant est pourtant bien restée ancrée dans la littérature (Cuny & Benton, 1999; Cuny & Risnes, 2005; Gillis & Donoghue, 2007; Underwood, 2006).

Les Myliobatiformes apparaissent comme un groupe particulièrement pertinent pour évaluer les contraintes adaptatives s'appliquant à la microstructure de l'émailloïde. Ce groupe monophylétique, bien soutenu par des données moléculaires et morphologiques

12. Évaluation des hypothèses adaptatives

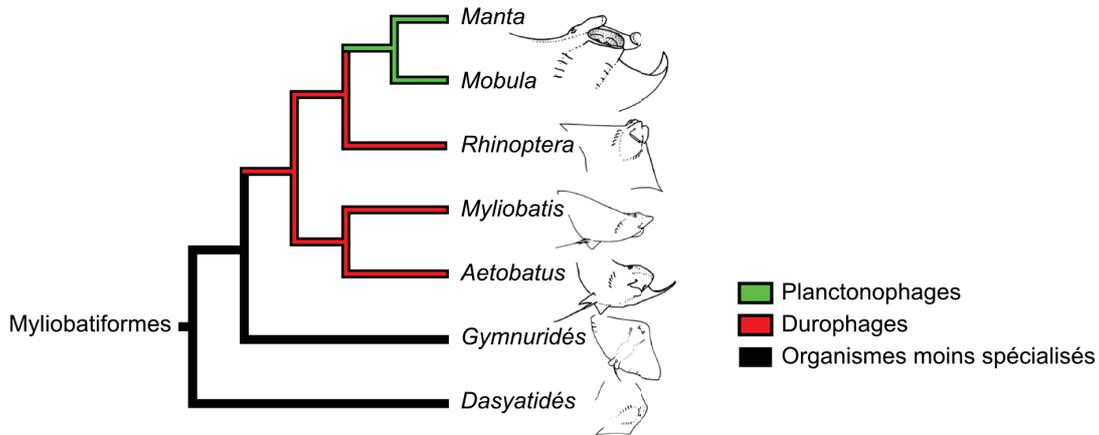


FIGURE 17. – Phylogénie et régime alimentaire des Myliobatiformes, d’après Aschliman et al., 2012; Dean et al., 2007; Dunn et al., 2003. Figure modifiée d’après Adnet et al. (2012)

(e.g. Aschliman et al., 2012; Dunn et al., 2003; Lovejoy, 1996; McEachran et al., 1996; Nishida, 1990), regroupe en effet des familles étroitement apparentées mais présentant des stratégies trophiques diamétralement opposées (figure 17), avec des formes durophages (Myliobatidae, Rhinopteridae) et des formes planctonophages (Mobulidae) (Adnet et al., 2012). On peut donc supposer que l’évolution de leur microstructure dentaire est susceptible de refléter à la fois les contraintes mécaniques liées à leur régime alimentaire et un signal phylogénétique, lié à leur histoire évolutive.

La question de l’impact mécanique de régimes alimentaires spécialisés sur la microstructure de l’émailloïde des batomorphes a fait l’objet d’une publication (Enault et al., 2013), disponible à la fin de cette partie. Ce travail est basé sur un échantillonnage de nombreux genres actuels et fossiles de Myliobatiformes, et en particulier des formes fossiles présentant une transition morphologique entre des formes durophages et des formes planctonophages (e.g. *Burnhamia*, *Plinthicus*) et constitue la première description détaillée de tissus dentaires hyperminéralisés se focalisant exclusivement sur les batomorphes. La publication de cet article est antérieure à celui qui est présenté dans le chapitre 10, et les données de microstructure dentaire des batomorphes étaient encore très limitées à ce moment là.

12. Évaluation des hypothèses adaptatives

Au moment de leur publication (Enault et al., 2013), ces résultats confirmaient plusieurs hypothèses préalablement formulées dans la littérature récente, à savoir que i) un émailloïde bien différencié, et en particulier la présence de la PBE, constitue en réalité une autapomorphie des sélachimorphes plutôt qu'une synapomorphie des néosélaciens (Cuny & Benton, 1999), ii) à l'exception des mobulidés, la microstructure de l'émailloïde des batoïdes représente probablement une morphologie plésiomorphique pour les néosélaciens, appuyant l'hypothèse de Cuny et al. (2009).

12.1. Microstructure dentaire des Myliobatiformes

La microstructure dentaire des Myliobatiformes durophages et des Rajiformes échantillonnés afin de polariser les observations est alors décrite comme composée de deux couches distinctes, dont les relations d'homologie avec les structures connues chez les requins (la « triple couche ») ne sont pas clairement établies. Il est en revanche clair que la PBE est absente chez tous les taxons de batoïdes échantillonnés, sans qu'il soit possible de conclure s'il s'agit d'une perte secondaire ou non. Au contraire, les myliobatiformes planctonophages présentent systématiquement une couche fine et non différenciée d'émailloïde (SCE). Cette observation s'appuie sur l'échantillonnage de plus de la moitié des espèces de mobulidés actuelles, ainsi que sur plusieurs formes fossiles, dont certaines ne sont probablement pas exclusivement planctonophages (Enault et al., 2013).

L'émailloïde apparemment très simplifié des mobulidés est alors interprété comme un état dérivé résultant de la perte de l'une des « couches » décrites chez les autres batoïdes dans ce travail. Cette simplification est considérée comme étant liée à la disparition des contraintes mécaniques imposées par un régime durophage au cours de l'évolution du groupe. Chez le genre *Manta*, un des taxons planctonophages les plus dérivés, les dents des rangées supérieures sont même perdues secondairement au cours de l'évolution du groupe (Adnet et al., 2012; Marshall, 2009). Cette particularité peut s'expliquer par le fait que les chondrichthyens présentent souvent un comportement pré-copulatoire complexe au cours duquel le mâle mord les nageoires de la femelle (Pratt & Carrier, 2001). Ce comportement est également documenté chez les formes planctonophages (Deakos, 2012; Yano et al., 1999) et il est donc probable que les dents de ces espèces ne servent plus qu'en période de reproduction. L'absence de contraintes fonctionnelles imposées

12. Évaluation des hypothèses adaptatives

par une alimentation « dure » a ainsi pu conduire à l'évolution de morphologies et d'ornementations atypiques des dents chez certaines formes planctonophages (Adnet et al., 2012), et la conclusion principale de ce travail était que l'évolution de l'émailloïde reflétait d'avantage les spécialisations écologiques de ces animaux plutôt que leur histoire évolutive commune.

Certaines des observations réalisées dans le cadre de cette publication se sont révélées inexactes par la suite (Enault et al., 2015a), ce qui est principalement dû à la mauvaise interprétation de certaines images réalisées en microscopie électronique. Ce problème concerne la description de ces deux « couches » dans l'émailloïde des myliobatiformes durophages. Le ré-examen de certains taxons, notamment en utilisant un microscope plus performant, ainsi qu'un échantillonnage plus large a révélé par la suite que l'ensemble des myliobatiformes présente en réalité un émailloïde non différencié et décrit dans le chapitre 10. Il est toujours constitué d'une seule unité, d'épaisseur variable, mais relativement fine comparé aux autres batomorphes (Enault et al., 2015a). Cette morphologie est conservée chez tous les genres actuels et fossiles de myliobatiformes examinés, indépendamment de leur régime alimentaire et de leur morphologie dentaire. Si un émailloïde réduit semble congruent avec un régime alimentaire peu contraignant d'un point de vue fonctionnel, tel que la planctivorie, l'existence de ce type de morphologie chez des taxons durophages s'avère en revanche très surprenante. En effet, la durophagie est probablement le régime alimentaire imposant le plus de contraintes fonctionnelles non seulement à la dentition, mais également à l'ensemble de l'appareil masticateur, y compris aux tissus mous qui y sont associés.

Ce type de régime est apparu plusieurs fois de manière indépendante chez les batoïdes, notamment chez les Rajiformes (*Rhina*, *Zapteryx*) et chez les Myliobatiformes (eg. *Pastinachus*, Myliobatidae, Rhinopterae, la durophagie étant probablement hérité d'un ancêtre commun chez ces deux dernières familles (Dean et al., 2007; Notarbartolo Di Sciara, 1987; Summers, 2000). Les adaptations morphologiques à ce type de régime chez les vertébrés incluent notamment une réduction du nombre de dents (ce qui est très visible chez les myliobatiformes durophages, en particulier *Aetobatus*) et des cuspidés peu développées (Kolmann et al., 2014). Chez les myliobatiformes durophages, les demandes fonctionnelles associées à ce type de régime sont prises en charge par une épaisseur massive de dentine, et par l'ensemble de l'appareil masticateur, ce qui se traduit notamment

12. Évaluation des hypothèses adaptatives

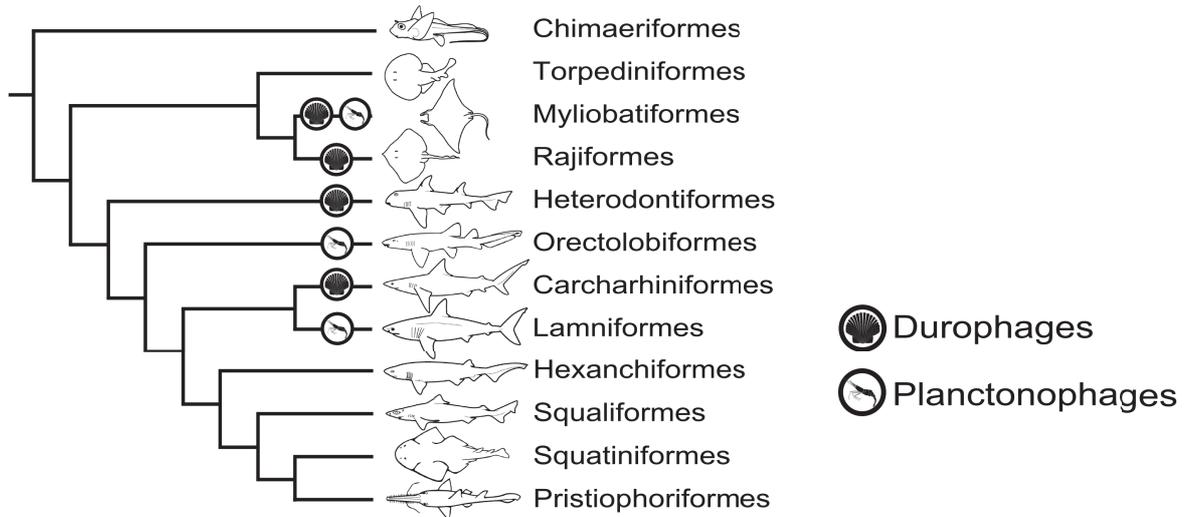


FIGURE 18. – Évolution indépendante de régimes alimentaires spécialisés chez les néosélaciens. Topologie basée sur Douady et al. (2003) et McEachran & Aschliman (2004).

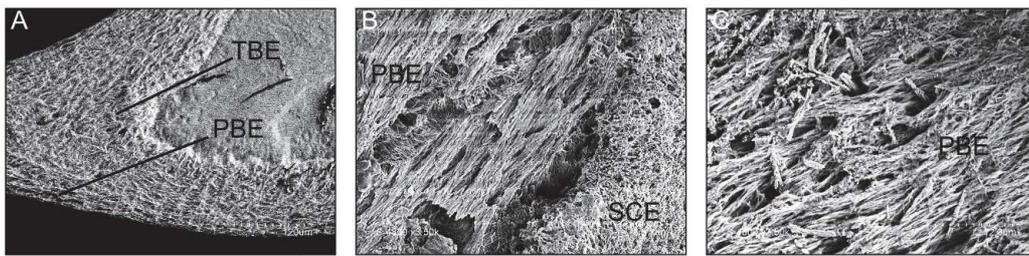


FIGURE 19. – Microstructure dentaire des sélachimorphes planctonophages : **A** : *Cetorhinus maximus*, coupe longitudinale. Échelle : 60 μm . **B** : PBE et SCE d'un spécimen de *Rhincodon* sp. du Miocène de Belgique. Échelle : 5 μm . **C** : PBE de *Rhincodon typus*. Échelle : 6 μm .

par une fusion des symphyses, une calcification prismatique multicouche et par une trabéculatation du palatocarré et du cartilage de Meckel (« piliers » minéralisés inclus dans la matrice cartilagineuse en plus de la calcification prismatique de surface) (Dean et al., 2007; Dingerkus et al., 1991; Summers, 2000). La zone de transition entre les deux tissus dentaires principaux, l'émailloïde et la dentine, peu étudiée, pourrait également apporter de nouveaux éléments de réponses à la question de la gestion du stress mécanique lors de la prise alimentaire. Ces adaptations permettent de pallier à un émailloïde très réduit, et dont la microstructure ne semble pas conférer d'avantage fonctionnel dans le cadre d'un régime aussi mécaniquement demandeur que la durophagie. Les dents fonctionnelles les plus vieilles sont d'ailleurs presque dépourvues d'émailloïde, celui-ci étant rapidement abrasé lorsque l'animal se nourrit.

12.2. Spécialisations trophiques chez les sélachimorphes

Des régimes alimentaires très spécialisés sont également apparus de manière itérative chez les requins, avec des formes durophages au sein des Hétérodontiformes (*Heterodontus* spp.) et des Carcharhiniformes (*Mustelus* spp., *Sphyrna tiburo*), dont la spécialisation dentaire n'est toutefois pas aussi poussée que chez *Heterodontus*. Des formes planctonophages existent au sein des Orectolobiformes (*Rhincodon typus*) et des Lamniformes (*Cetorhinus maximus*, *Megachasma pelagios*) (figure 18). Étant donné les résultats obtenus chez *Heterodontus*, qui sont d'ailleurs à l'origine des hypothèses adaptatives touchant à la structuration de l'émailloïde des raies (Preschoft et al., 1974), d'autres taxons de sélachimorphes présentant des stratégies trophiques spécialisées ont été échantillonnés afin de déterminer si la microstructure dentaire des dents latérales d'*Heterodontus* constitue un cas unique au sein des néosélaciens. Si l'émailloïde de *Megachasma* n'a pas pu être examiné en raison de la rareté de ce genre, tous les autres taxons sont caractérisés par un émailloïde complexe, bien différencié, et présentent une composante PBE dont les faisceaux sont orientés de manière parallèle à la surface de la couronne, ce qui est illustré dans la figure 19 par *C. maximus* (figure 19-A) et deux spécimens de *Rhincodon* : un fossile datant du Miocène (figure 19-B) et un spécimen actuel (figure 19-C), où la PBE caractéristique est nettement visible.

La microstructure de l'émailloïde des requins apparaît donc très conservée quel que soit le régime alimentaire considéré, ce qui n'est pas le cas des batoïdes chez qui elle est plus variable, à l'exception des Myliobatiformes, clade présentant pourtant les préférences trophiques les plus spécialisées. En se basant sur ces observations, l'impact du régime alimentaire sur l'évolution de la microstructure de l'émailloïde des néosélaciens apparaît négligeable. Celle-ci semble en revanche partiellement corrélée à la morphologie dentaire chez certains taxons (Enault et al., 2015a), et compte tenu de la microstructure très stable existant chez les sélachimorphes et chez les myliobatiformes, il est probable qu'elle reflète également un signal phylogénétique. Les Rajiformes semblent toutefois caractérisés par un spectre de variation beaucoup plus large : certains taxons possèdent un émailloïde dépourvu d'organisation, très similaire à la microstructure des Myliobatiformes, comme *Hypsobatis* (Enault et al., 2015a) et *Belemnobatis aominensis* (Cuny et al., 2009), ou au contraire beaucoup plus complexe et bien différencié comme c'est le cas pour certains

12. Évaluation des hypothèses adaptatives

sclérorhynchiformes. Compte tenu de la diversité taxonomique considérable du groupe, un échantillonnage plus poussé permettrait certainement d'identifier les facteurs sous-tendant cette variation.

13. Intérêt des caractères microstructuraux

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail a permis de mettre en évidence une diversité de microstructures inattendue au sein des batoïdes, et la littérature récente (Guinot et al., 2013; Enault et al., 2015a) suggère qu'une diversité similaire existe probablement au sein des chondrichthyens dans leur ensemble, à l'exception des sélachimorphes. Considérant l'échantillonnage encore limité dont la plupart de ces taxons (holocéphales et formes paléozoïques en particulier) ont fait l'objet dans la littérature, les limites et la répartition de cette variation demeurent mal connues. Les hypothèses adaptatives liées à des types écologiques sont en tout cas invalidées par les observations réalisées sur les taxons de néosélaciens présentant les spécialisations trophiques les plus marquées. Afin d'estimer l'intérêt des caractères microstructuraux, les observations réalisées sur l'ensemble des batomorphes sont schématisées dans la figure 20. Celle-ci illustre la répartition stratigraphique (figure 20-A) et la distribution des grands types de microstructure dentaire en fonction de trois hypothèses phylogénétiques conflictuelles, morphologique (McEachran & Aschliman, 2004) et moléculaires (Aschliman et al., 2012; Pavan-Kumar et al., 2014) respectivement (figure 20-B-D). Ces trois phylogénies ont été sélectionnées dans la mesure où elles illustrent le mieux les variations de relations inter-ordinales existant chez les batoïdes, mais d'autres topologies existent (e.g. Maisey et al., 2004; Underwood et al., 2015). Ces phylogénies n'incluent que les groupes ayant encore des représentants actuels étant donné que le placement des familles fossiles demeure très incertain (e.g. Kriwet (2004) pour les sclérorhynchiformes) en dehors de leur appartenance ordinale. Les hybodontes ont été sélectionnés comme groupe externe dans la mesure où leur histologie dentaire est relativement bien connue comparé aux autres taxons non-néosélaciens.

Les premières raies (Archeobatidae) présentent déjà une microstructure complexe et relativement bien différenciée (20-A), bien que la famille soit considérée par certains

13. Intérêt des caractères microstructuraux

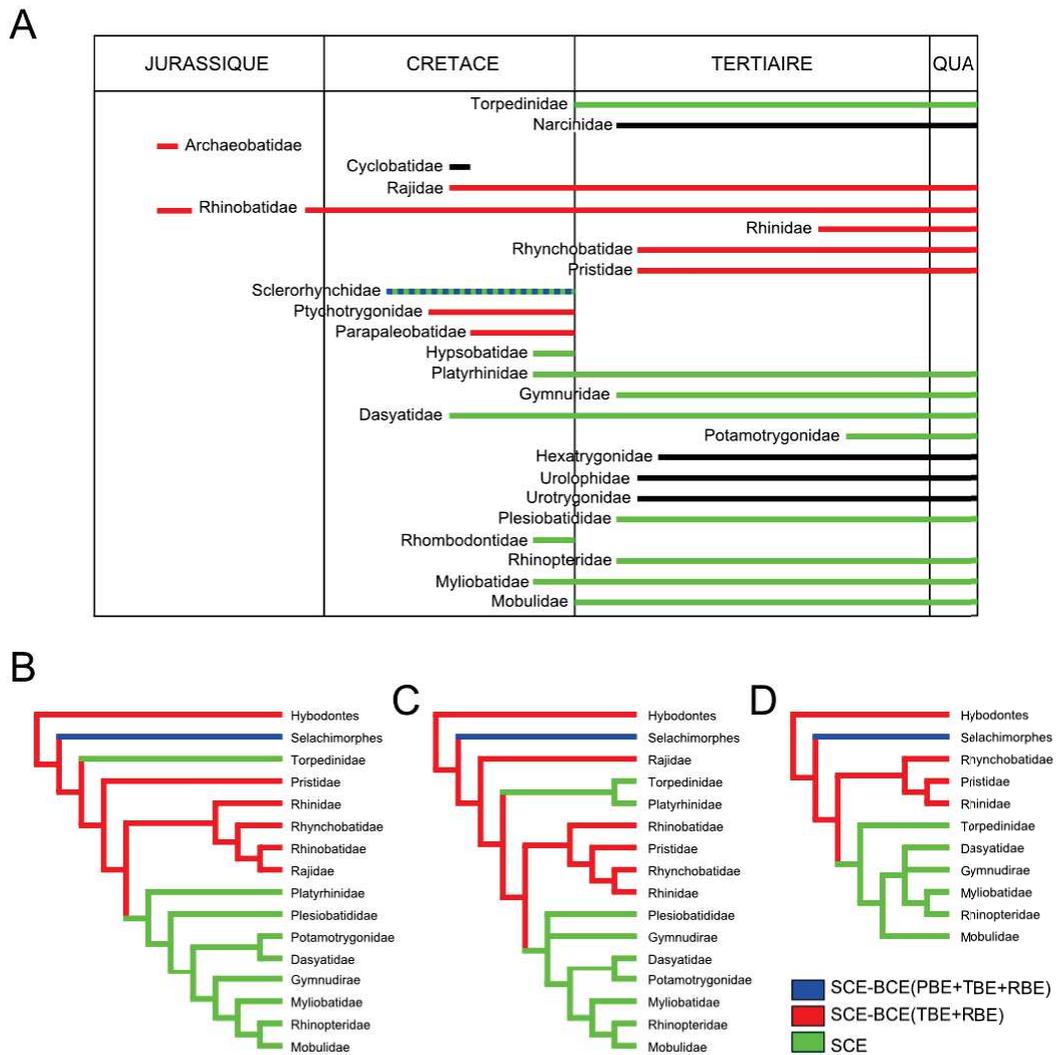


FIGURE 20. – Répartition des caractères microstructuraux au sein des batoides. **A** : répartition stratigraphique des familles actuelles et fossiles. **B** : phylogénie basée sur des données morphologiques (modifié d'après McEachran & Aschliman (2004)). **C-D** : phylogénies basées sur des données moléculaires. **C** : modifié d'après Aschliman et al. (2012). **D** : modifié d'après Pavan-Kumar et al. (2014)

13. Intérêt des caractères microstructuraux

auteurs comme un groupe de squatinomorphes (Herman & van Vaes, 2014), ce qui est toutefois improbable considérant d'une part la morphologie dentaire, et d'autre part, la microstructure de leur émailloïde. En effet, si celle-ci est plus complexe que la SCE documentée chez la plupart des hybodontes et des autres chondrichthyens fossiles, elle ne montre en revanche aucune trace de la PBE présente chez les sélachimorphes. Au sein des Rajiformes, les microstructures les plus singulières sont observées dans les dents de certains sclérorhynchidés (*Pucapristis*, « *Onchosaurus* »), chez qui elle est très similaire à celle des sélachimorphes. Enfin, le Tertiaire est marqué par la radiation rapide de nombreuses familles de Myliobatiformes, caractérisés par un émailloïde non différencié malgré des régimes alimentaires très différents.

Moins diversifiées que les Rajiformes et les Myliobatiformes, les Torpediniformes n'ont pas fait l'objet d'un effort d'échantillonnage aussi important que les autres clades, principalement en raison de l'absence de disponibilité de matériel fossile et étant donnée la taille très réduite du matériel dentaire actuel, qui a considérablement compliqué leur préparation et leur observation. Seule une des deux familles (Torpedinidae) a donc été examinée. Les torpilles constituent un clade de raies morphologiquement très dérivées, capables de délivrer des décharges électriques grâce à des organes spécialisés. Il s'agit également des seuls batoïdes totalement dépourvus de denticules dermiques (Cappetta, 2012). Au sein des batoïdes, leur position phylogénétique demeure problématique : leur morphologie squelettique partage de nombreux caractères plésiomorphes, notamment dans la structure des arcs branchiaux, avec les sélachimorphes et plusieurs taxons de Rajiformes ce qui, couplé à l'absence de synapomorphies avec d'autres raies, en fait systématiquement le groupe frère de tous les autres batoïdes dans les études morphologiques (McEachran et al., 1996; McEachran & Aschliman, 2004; Claeson, 2014). Plusieurs phylogénies basées sur des données moléculaires soutiennent en revanche une position alternative dans l'arbre des batoïdes (Aschliman et al., 2012; Heinicke et al., 2009; Mallatt & Winchell, 2007).

Dans ce contexte trois points distincts peuvent être abordés en ce qui concerne : i) les arguments que la microstructure dentaire peut apporter au débat concernant le placement des torpilles, ii) ce que les données obtenues chez les batoïdes indiquent quant à l'état ancestral de cette microstructure chez les néosélaciens et iii) l'intérêt de ces caractères dans un contexte phylogénétique ou taxonomique plus global.

13. Intérêt des caractères microstructuraux

La première topologie (figure 20-B) est obtenue sur la base de données morphologiques. Les hybodontes et les sélachimorphes sont utilisés comme groupe externe. Ces derniers présentent leur microstructure caractéristique (SCE/BCE (RBE+PBE+TBE), codé en bleu) tandis que les hybodontes possèdent une microstructure variant entre un émailloïde non différencié et une organisation mieux structurée (SCE/BCE (RBE+TBE)). Cette situation, qui caractérise également la plupart des Rajiformes est codée en rouge. Enfin, la microstructure non différenciée observable chez les torpilles et chez l'ensemble des myliobatiformes est codée par la couleur verte. L'optimisation de ce caractère par maximum de parcimonie (réalisée avec le logiciel Mesquite (Maddison & Maddison, 2009)) sur cette topologie indique une acquisition indépendante d'une microstructure dépourvue d'organisation (SCE) chez les Torpediniformes et chez les Myliobatiformes. La microstructure caractéristique des sélachimorphes apparaît donc comme une apomorphie, ce qui est supporté par les données fossiles (les premiers sélachimorphes présentant encore une microstructure peu différenciée (Andreev & Cuny, 2012)). La microstructure de certains sclérorhynchiformes constitue donc probablement un phénomène de convergence. L'existence d'une microstructure très similaire chez les hybodontes et la plupart des Rajiformes indique que ce type d'organisation constitue un caractère plésiomorphique pour les batoïdes, en accord avec Cuny et al. (2009).

Au cours de ces dernières années la phylogénie moléculaire a permis de proposer des topologies alternatives aux hypothèses basées sur des travaux morphologiques. La seule étude moléculaire à considérer simultanément tous les clades de batoïdes fait des torpilles un groupe frère des Platyrrhinidae (Aschliman et al., 2012), des raies guitares qui sont pourtant parfois incluses au sein des Myliobatiformes dans certaines analyses (e.g. McEachran et al., 1996), ce qui est pourtant en forte contradiction avec leur morphologie dentaire (Cappetta, 2012). Cette topologie suggère toujours une acquisition indépendante d'une SCE unique chez le clade Torpedinidae+Platyrrhinidae et chez les Myliobatiformes, et la morphologie SCE+BCE (sans PBE) est toujours interprétée comme morphologie ancestrale pour les néosélaciens.

Dans la topologie de Pavan-Kumar et al. (2014), les torpilles sont placées comme groupe frère des Myliobatiformes, une topologie assez surprenante et qui n'est malheureusement pas discutée dans leur travail. D'autres taxons présentent également des relations inédites comme la position du genre *Mobula* à l'extérieur du clade *Rhinoptera*+*Aetobatus*, où les

13. Intérêt des caractères microstructuraux

relations au sein des requins squaléens. Cette topologie suggère toutefois une acquisition unique d'une microstructure très simplifiée chez les torpilles et les myliobatiformes. Les torpilles ont une apparition tardive dans le registre fossile par rapport aux autres clades, et ne sont pas documentées avant le Paléocène (Kriwet & Benton, 2004; Underwood, 2006). Cette apparence tardive dans le registre fossile semble donc *a priori* plus cohérente avec le placement phylogénétique obtenu par Aschliman et al. (2012) et Pavan-Kumar et al. (2014), mais peut également être dû à des biais de fossilisation liés à un squelette peu minéralisé et à une morphologie dentaire caractéristique ayant évolué tardivement au sein du groupe. Considérant l'ensemble des travaux publiés jusqu'à présent, et basés soit sur des données morphologiques soit sur des données moléculaires, une telle topologie semble toutefois peu vraisemblable à l'heure actuelle. Si la présence d'une SCE est effectivement confirmée pour l'ensemble de Torpédiniformes, il est donc plus parcimonieux de considérer une acquisition indépendante chez ces dernières et chez les Myliobatiformes.

Les résultats obtenus au cours de ce travail indiquent donc que quel que soit le scénario évolutif considéré, une microstructure de type hybodonté/rajiforme, généralement composée de SCE/BCE et d'une complexité et degré de différenciation variable constitue une morphologie ancestrale chez les néosélaciens. Il est pour le moment difficile d'étendre cette hypothèse à l'ensemble des chondrichthyens dans la mesure où la microstructure des chimères et de nombreux groupes paléozoïques demeure peu connue. L'utilisation de cette microstructure dans un contexte taxonomique est toutefois à utiliser avec prudence, et pour l'heure à réserver uniquement à les taxons où elle semble stable, par exemple chez les myliobatiformes et chez les sélachimorphes.

S'il semblait *a priori* raisonnable de penser que la microstructure dentaire puisse être le résultat d'une interaction entre des facteurs multiples, notamment historiques (phylogénie), biomécaniques (fonctionnels) et morphologiques (liés à la morphologie dentaire), les résultats discutés dans les chapitres précédents indiquent que : i) il semble en effet exister une relation entre la morphologie dentaire et la microstructure (chapitre 10) ; ii) les hypothèses adaptatives concernant l'évolution de la microstructure dentaire chez les néosélaciens ne sont pas soutenues par les observations réalisées chez les batoïdes et les sélachimorphes. Leur microstructure dentaire semble en effet être plus liée à leur histoire évolutive qu'à des facteurs fonctionnels (chapitre 12) ; cependant, la co-existence de mi-

13. Intérêt des caractères microstructuraux

crostructures radicalement différentes au sein de groupes phylogénétiquement proches et possédant des dents de dimension et de morphologie globale similaires, comme ce qui est décrit chez les sclérorhynchidés (chapitre 11) complique considérablement cette question et suggère que la microstructure dentaire de certains néosélaciens ne reflète pas exclusivement leur histoire évolutive.

Les résultats obtenus dans ce travail soulèvent également deux problèmes principaux. Premièrement, ils soulignent que la compréhension des tissus hyperminéralisés chez les poissons cartilagineux reste très fragmentaire, ce qui est notamment dû à l'étude détaillée d'un nombre limité de taxons comparé à la diversité importante du groupe. Depuis les travaux de Reif (1973), plusieurs hypothèses ont été proposées quant à l'évolution de l'émailloïde au sein des chondrichthyens, mais également en ce qui concerne sa distribution dans leur arbre phylogénétique et les relations d'homologie entre les différentes structures observées (Andreev & Cuny, 2012; Gillis & Donoghue, 2007). D'autre part, la grande majorité des travaux portant sur la microstructure de l'émailloïde des chondrichthyens sont en réalité restreints aux sélachimorphes et aux hybodontes, tandis que la microstructure d'autres groupes, notamment les raies, les chimères et de nombreux groupes paléozoïques restait peu étudiée voire inconnue. Si l'objectif principal de cette partie était de combler le manque de données existant sur les batoïdes, de nombreux autres groupes, en particulier les chimères, méritent encore un échantillonnage plus exhaustif.

14. Publications associées

14.1. Publication 1 : « Chondrichthyan tooth enameloid : past, present, and future »

Chondrichthyan tooth enameloid :
past, present, and future

Sebastien Enault, Guillaume Guinot, Martha B. Koot, Gilles Cuny

Zoological Journal of the Linnean Society

Volume 174, pages 549-570, 2015

Des résultats issus de cette publication ont été présentés aux sixièmes *Rencontres de l'Ichthyologie en France* (RIF) à Paris, en Mars 2015.



Chondrichthyan tooth enameloid: past, present, and future

SÉBASTIEN ENAULT^{1*}, GUILLAUME GUINOT², MARTHA B. KOOT³ and GILLES CUNY⁴

¹*Laboratoire de Paléontologie, Institut des Sciences de l'Évolution de Montpellier (ISE-M, UMR 5554, CNRS, UM2, IRD), c.c. 064, Université Montpellier 2, place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier Cedex 05, France*

²*Department of Geology and Palaeontology, Natural History Museum of Geneva, Route de Malagnou 1, CP 6434, CH-1211 Geneva 6, Switzerland*

³*25 Honicknowle Lane, Plymouth, PL2 3QS, UK*

⁴*UMR CNRS 5276 ENS LGLTPE, Université Claude Bernard Lyon 1, Campus de la Doua, Bâtiment Géode, 2, rue Raphaël Dubois, F-69622 Villeurbanne Cedex, France*

Received 1 October 2014; revised 13 January 2015; accepted for publication 14 January 2015

Enameloid is a hard mineralized tissue covering chondrichthyan and actinopterygian teeth. Over the past 40 years, it has been extensively studied in various extinct and extant sharks, leading to the broad use of microstructural characters to differentiate between hybodont and neoselachian teeth. However, the chondrichthyan taxic diversity is disproportionately high compared to the number of taxa explored for enameloid microstructure, and the generalization of these few observations to the whole group is problematic. Indeed, many other groups, in particular modern rays and skates, have been completely overlooked, and almost nothing is known about their tooth histology. Furthermore, the recent discovery of typical neoselachian character in cladodontomorph sharks teeth clearly indicates that we have had an over-simplified perception of the chondrichthyan enameloid distribution, which put into question the previously proposed evolutive scenarios dealing with this tissue. We propose a brief historical overview of the study and understanding of chondrichthyan enameloid diversity and briefly discuss preparation issues encountered when dealing with the study of chondrichthyan hypermineralized tissues. Then, the variation of enameloid microstructures encountered in ctenacanthiforms, hybodonts, selachimorphs, and batomorphs is explored, summarized, and discussed. Although the full extent of the diversity and variability of the enameloid microstructure in many of these groups and others remains to be fully determined, we are able to show that most possess a much more complex enameloid microstructure than expected, and propose a revised and more fitting chondrichthyan enameloid terminology, based on the recognition of two main units: an external Single Crystallite Enameloid (SCE) and an internal Bundled Crystallite Enameloid (BCE). Our study reveals new insights in the understanding of character distribution among batomorphs and sets a framework for tackling global chondrichthyan tooth enameloid evolution.

© 2015 The Linnean Society of London, *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2015, **174**, 549–570.

doi: 10.1111/zoj.12244

ADDITIONAL KEYWORDS: batomorph – elasmobranch – fossil – microstructure – shark – tooth histology.

INTRODUCTION

Vertebrates exhibit a great diversity of tooth-like structures, in terms of shape, function, and microstructure.

They are usually found in the oral cavity, although they can also be located on other parts of the body (e.g. rostral teeth) or can even constitute a complete body covering (dermal denticles). The study of these tissues has long been of particular interest to several fields of research, as exemplified by the extensive literature published on the subject over the last decades.

*Corresponding author.

E-mail: sebastien.enaault@univ-montp2.fr

These traditionally include palaeontology and biology, mainly because teeth are, along with the jaw apparatus, at the interface between the organism and its food, and as such are susceptible to hold both functional and phylogenetic information. Because of their hypermineralized nature, teeth are also more easily fossilized than skeletal remains, and even make the bulk of the fossil record of certain groups, such as chondrichthyans, of which complete skeletons remain scarce (Cappetta, 1987, 2012). More recently, they have drawn the attention of physicists (Enax *et al.*, 2012), geochemists (Fisher *et al.*, 2013), and archaeologists (Cione & Bonomo, 2003; Drew, Philipp & Westneat, 2013), demonstrating that teeth and their various properties are indeed at the interface between numerous disciplines.

Subsequent to work by Reif (1973), it has been largely accepted that neoselachians (modern sharks, skates, and rays and their extinct representatives) possess a triple-layered enameloid: a hypermineralized tissue of supposed ectodermal and mesenchymal origin (Francillon-Vieillot *et al.*, 1990; Gillis & Donoghue, 2007). This triple-layered enameloid was considered both the only neoselachian dental synapomorphy and a solid criterion to differentiate them from other extinct forms [including their sister group (the Hybodontiformes) and all stem chondrichthyans]. Most studies until now have focused on crown neoselachians and hybodonts, whereas others (Gillis & Donoghue, 2007) also attempted to resolve the phylogeny, homologies, and ancestral state of chondrichthyan enameloid by sampling and analyzing stem chondrichthyans.

Novel data (Enault, Cappetta & Adnet, 2013; Guinot *et al.*, 2013) have hinted at unsuspected diversity in the enameloid microstructure of some chondrichthyan lineages. These works underline the urgent need for a complete reassessment of the diversity and distribution of chondrichthyan enameloid microstructures. They also highlight three main issues. (1) We have had an over-simplified perception of the chondrichthyan enameloid for over 40 years, which calls into question hypotheses formulated on the homologies, evolution, and phylogenetic distribution of this tissue. This might also be true for actinopterygian enameloid, known to exhibit its own complex and diverse microstructures (Reif, 1979; LeGeros & Suga, 1980; Miake *et al.*, 1991; Sasagawa *et al.*, 2009; Andreev, 2011). (2) Most studies focused exclusively on hybodonts and selachimorphs, mainly because the three-layered criterion was found to be very useful to discriminate representatives of the Hybodontiformes from Selachimorpha. As a result, stem chondrichthyan, holocephalan and batomorph enameloid microstructure remains very poorly known. (3) The chondrichthyan taxic diversity is disproportionately high compared to the number of taxa explored for enameloid purposes,

and the generalization of the few observations made so far to the whole group is problematic.

Complete resolution of these issues will probably require a lot of time and the concerted effort of many researchers, and the present study proposes a first step in this direction. Our first aim is to provide a brief historical overview of the study and understanding of chondrichthyan enameloid diversity subsequent to the work of Reif (1973). Subsequently, technical and preparation issues encountered when dealing with the study of chondrichthyan hypermineralized tissues will be reviewed. Most importantly, the variation of enameloid microstructures encountered in several key chondrichthyan groups, namely ctenacanthiforms, hybodonts, and other extinct relatives of modern sharks and batomorphs, is explored, summarized and discussed.

HISTORICAL BACKGROUND

The study of fish tooth histology can be traced back to the end of the mid-19th Century with the classic work of Agassiz: *Recherches sur les poissons fossiles* (1833–1843). Also worth mentioning are the publications of Owen (1840–1845), Jaekel (1891) and Tomes (1898) toward the end of the 19th Century, who investigated the dental histology of some fossil taxa. However, it was not until the mid-20th Century that these structures were studied in a more systematic way, using a wide range of experimental techniques and focusing on both extant and extinct taxa. A number of researchers, such as Kvam (1952, 1953a, b), Poole (1952, 1960, 1962, 1967), Ørvig (1950, 1966, 1967) or Moss (1964, 1970), focused their efforts on various actinopterygian and chondrichthyan taxa, and studied both the ontogeny (Lison, 1941; Kvam, 1950; Kerr, 1955) and diversity (Thomasset, 1928; Levi, 1939a, b; Kvam, 1946; Kerr, 1960; Radinsky, 1961) of hypermineralized tooth tissues. Through their work, they tried to understand the potential systematic and functional value of tooth histology, a question that remains open at the present time. Although some of these works led to hypotheses that can no longer be accepted (e.g. grouping of psammodonts and cochliodontonts within batomorphs; Thomasset, 1930), it appeared that tooth histology could indeed be used as a taxonomic criterion for specific groups, although it may also show some degree of convergence and reflect adaptive constraints (Preuschoft, Reif & Müller, 1974) rather than true phylogenetic relationships (Radinsky, 1961).

Because of difficulty in accurately observing enameloid microstructure, early studies focused on dentine instead, although enameloid was considered as a form of dentine in some studies (Peyer, 1968). As a result, a great variety of dentine and dentinous tissues were described (Ørvig, 1967), with the validity of some being subsequently

questioned by Radinsky (1961). A formal review and discussion of these various types of dentine is however beyond the scope of the present study, and further information can be found in the works of Ørvig (1950, 1967) and Peyer (1968).

The origin and composition of enameloid has been disputed for over a century (Prostak & Skobe, 1988). Although it bears similarities with tetrapod enamel (i.e. both are hypermineralized tissues covering the tooth crown), they differ in their microstructure and protein matrix (Gillis & Donoghue, 2007) and cannot be considered homologous (Kemp, 1999). Enamel is an ectodermic product resulting from the mineralization of a proteinaceous extracellular matrix (mainly amelogenins, enamelines and ameloblastins). Its incremental formation follows the mineralization of the underlying dentine, the protein matrix of which is produced by odontoblasts. Enameloid is supposed to be an ectomesenchymal product, resulting from the secretion of both the ameloblasts and the odontoblasts, although the precise contribution of each cellular type remains poorly understood. It is considered to result from the mineralization of an ectomesenchymal collagenous matrix (Moss & Jones, 1964; Sasagawa, 2002; Gillis & Donoghue, 2007), although it has also been argued that the protein matrix is noncollagenous (Levine *et al.*, 1966) and made of a keratin-like protein instead (Kawasaki *et al.*, 1980; Everett & Miller, 1981). Further details on this are provided elsewhere (Poole, 1967; Kemp & Park, 1974; Francillon-Vieillot *et al.*, 1990; Sasagawa & Akai, 1992; Gillis & Donoghue, 2007).

The presence of enamel-specific proteins, such as enamelin and tuftelin in chondrichthyan enameloid, has also been reported (Herold, Graver & Christner, 1980; Satchell *et al.*, 2002). However, those findings are based on immunochemistry techniques involving mammalian antibodies, which raise the issue of specificity and cross-reactivity, especially because other works based on the same techniques did not detect those proteins (Ishiyama *et al.*, 1994). In summary, the presence of these proteins remains dubious until the associated gene expression patterns are investigated. It should further be noted that, despite subtle variation in the mineralization patterns and the composition of the organic matrix, it is now established that chondrichthyan and actinopterygian enameloid can be regarded as homologous structures (Gillis & Donoghue, 2007).

Before the work of Reif (1973), a limited amount of research was devoted to extant taxa compared to fossil ones. Based on the study of numerous fossil and extant taxa, Reif (1973) proposed that neoselachian teeth could be characterized by a triple-layered enameloid. These three structural layers are the external Shiny Layered Enameloid (SLE; composed of randomly oriented individual crystallites), the intermediate Parallel-Bundled Enameloid (PBE; bending-resistant layer made

of bundles of crystallites oriented parallel to each other and to the crown surface); and the internal Tangled-Bundled Enameloid (TBE; compression-resistant layer made of randomly oriented bundles of crystallites). Some studies (Reif, 1977; Cuny & Benton, 1999; Gillis & Donoghue, 2007) used an alternative terminology, although that of Cuny, Rieppel & Sander (2001) is followed here (but see also the section on Systematics and Terminology). This three-layered microstructure was considered a reliable criterion to distinguish between neoselachians and hybodonts, as well as other stem chondrichthyans, which were considered to possess a simple single-layered enameloid, the Single Crystallite Enameloid (SCE), lacking notable microstructural differentiation. This characteristic has subsequently been heavily relied upon, and microstructure studies were routinely performed on this basis on a wide variety of fossil and extant specimens (Cuny & Risnes, 2005; Gillis & Donoghue, 2007; Andreev, 2010; Guinot & Cappetta, 2011).

Reif (1977) noted that batomorph tooth enameloid was poorly calcified and reduced to such an extent that it was particularly difficult to study its microstructure. For these reasons, batomorph tooth enameloid microstructure remained uninvestigated but it was considered that their enameloid was exclusively composed of a TBE layer (Reif, 1977), although two layers were noted by Cappetta (2012) in some batomorphs. More importantly, the placement of batomorphs within the elasmobranch phylogeny has long been controversial. Early morphological studies (Regan, 1906; Holmgren, 1941) considered batomorphs as a sister group to selachimorphs, although they have been for some time regarded as a derived shark group related to pristiphoriforms and squatiniforms, resulting in the hypnosqualean hypothesis (Shirai, 1992). Being considered as derived sharks that lost the SLE and PBE layers (Reif, 1977; Thies, 1982), the batomorph tooth enameloid remained largely overlooked and the PBE was considered an autapomorphy of neoselachian sharks (selachimorphs) only (Cuny & Benton, 1999). The hypnosqualean hypothesis was later rejected by molecular studies that supported the monophyly of the selachimorphs (Douady *et al.*, 2003; Maisey, Naylor & Ward, 2004; Winchell, Martin & Mallatt, 2004) and placed the monophyletic batomorphs as sister group to all selachimorphs (Aschliman *et al.*, 2012).

Established hypotheses on the distribution of enameloid characters within chondrichthyan clades have recently been challenged. First, Cuny *et al.* (2001) described the enameloid microstructure of Triassic durophagous hybodonts (*Acrodus spitzbergensis* Hulke, 1873; *Acrodus cuneocostatus* and *Polyacrodus bucheri* Cuny, Rieppel & Sander, 2001) from North-western Nevada and revealed two distinct layers within the tooth enameloid cap of these taxa. Although this

discovery received few comments, it broke with the classic scheme of all Hybodontiformes possessing a single SCE layer. Andreev & Cuny (2012) subsequently identified early neoselachian teeth such as *Mucrovenator* Cuny, Rieppel & Sander, 2001 and *Rhomaleodus* Andreev & Cuny, 2012 lacking the inner TBE layer, which led to the proposal of an increasingly complex pattern of the selachimorph enameloid based on the progressive addition of the two bundled layers to the plesiomorphic SCE. Enault *et al.* (2013) further demonstrated that batomorphs exhibit a more complex enameloid microstructure than previously assumed and negated previous assertions that batomorph teeth possess a single layer of enameloid (Reif, 1977; Duffin, 1981; Cuny *et al.*, 2009). Instead, some taxa were shown to possess a two-layered enameloid, an observation that obviously raises issues on the homology of these layers within neoselachians. Finally, a PBE was recently identified in *Neosaivodus flagstaffensis* Hodnett, Elliott, Olson & Wittke, 2012, a ctenacanthiform from the Permian of Arizona (Guinot *et al.*, 2013), which suggests that the distribution of the parallel-bundled enameloid within chondrichthyans is more complex than previously assumed.

Our understanding of elasmobranch enameloid microstructure in a historical context can thus be summarized. (1) Neoselachians exhibit a triple-layered enameloid, whereas other chondrichthyans only possess a single layer of SCE. (2) Triple-layered enameloid is lacking in batomorph teeth and thus becomes a synapomorphy of selachimorphs only. (3) SLE is recognized as a remnant of the ancestral SCE, and the TBE appears later on, although its presence is sometimes questionable in early neoselachians. Therefore, only the PBE is considered a synapomorphy of selachimorph sharks. (4) PBE is recognized in non-neoselachian sharks, which makes its use as a taxonomic criterion questionable.

TECHNIQUES IN MICROSTRUCTURAL STUDIES

The histology of tooth tissues was traditionally investigated using ordinary and polarized light microscopy (Ørvig, 1967). During the 1950s, a wide range of techniques were trialled, including microradiography, X-ray diffraction analysis, electron microprobe analysis, and electron microscopy (Moss, 1961; Poole, 1967). Recent studies, however, predominantly rely on scanning electron microscopy techniques for the study of either etched surfaces or etched sections.

Etched surfaces

Standard protocol for etched surfaces requires direct acid-etching of the enameloid surface, without embedding or sectioning them. This is usually performed on the crown surface with different durations of acid ex-

posure to penetrate the enameloid layer to variable depths (Reif, 1973, 1977, 1978, 1979; Duffin, 1980; Duffin & Ward, 1993; Cuny, 1998; Godefroit *et al.*, 1998; Cuny & Benton, 1999; Cuny *et al.*, 2001; Guinot & Cappetta, 2011). Thus, surface etchings provide information on the distribution of enameloid structures over the whole crown, at a given depth within the enameloid cap. The main problem with this method is that the enameloid is almost completely destroyed at the end of the study. However, surface etchings can also be performed on natural breaks over the cusp to observe pseudosections within the crown.

Etched sections

Methods for etched section studies include embedding the teeth in transparent polyester or epoxy resin (Cuny & Risnes, 2005; Gillis & Donoghue, 2007; Guinot & Cappetta, 2011; Enault *et al.*, 2013). Depending on the size of the teeth, the resin blocks can then be cut (transversely or longitudinally) using a diamond saw and/or ground using a lapidary and abrasive paper until the desired plane of section is reached. Sections are then polished using a polishing pad and powder and etched briefly with acid. As a result, the preparation of etched sections is much more time-consuming than the preparation of etched surfaces but allows the observation of enameloid microstructures through the entire enameloid and dentine thickness.

Etching and coating

The acid etching process of the sections or surfaces classically involves the use of HCl, diluted or not. However, other acids, such as HNO₃ (Cuny & Risnes, 2005), H₃PO₄ (Sansom, Donoghue & Albanesi, 2005) or ethylenediaminetetraacetic acid (Carr *et al.*, 2006; Enax *et al.*, 2014), are also encountered in the literature. At the present time, no comparative study between the etching effects of these different acids exists in the literature.

A scanning electron microscopy (SEM) study of the samples requires a metallic coating of the specimens to enhance electron conductivity and to reduce charging effects. For this, a variety of alloys are used, such as gold-palladium alloy (Cuny & Risnes, 2005; Guinot & Cappetta, 2011).

Published enameloid microstructure analyses are frequently based on either sections or surfaces, yet a combination of both seldom occurs in the literature; but see also Guinot & Cappetta (2011). However, we argue that both are actually necessary to gain a comprehensive understanding of the enameloid microstructure of a given taxon. Although section studies offer an immediate overview of the global enameloid microstructure and enameloid–dentine boundary, destruction of the thin SLE is a very common section etching artefact (Reif, 1979). As a result, it might be difficult

to establish whether this structure is present or not. On the other hand, the study of etched surfaces allows the exploration of the microstructure by removing the enameloid gradually. Because the tooth surface is not completely etched, it allows for good preservation and observation of the superficial enameloid, at the same time as progressively revealing the inner parts of the enameloid cap until it is completely removed (Cuny *et al.*, 2001). Furthermore, the global integrity of the tooth is preserved by avoiding the need to section it. The drawback is that it requires multiple observations to understand the global microstructure because the samples have to be repeatedly etched in between SEM analyses. Ultimately, the choice of either section or etched surfaces will depend on the availability of the material, which might not be sufficient to do both.

MATERIAL AND METHODS

The present study is based on isolated fossil teeth belonging to the Ctenacanthiformes, Hybodontiformes, and Neoselachii, from which both sharks and rays were sampled. A complete list of the specimens investigated here, including age, localities, and SEM details, is provided in Table 1.

Specimens used for sections were embedded in transparent epoxy resin, and then ground to the desired plane of section (labiolingual longitudinal sections) with increasing grit silicon carbide abrasive paper and polished.

SYSTEMATICS AND TERMINOLOGY

The systematic framework and tooth terminology was conducted *sensu* Cappetta (2012). *Lissodus* Brough, 1935 was excluded from the Lonchidiidae following the work of Rees (2008).

Chondrichthyan tooth enameloid terminology has evolved throughout the gradual understanding of its microstructural features, arrangement, diversity and development (e.g. disused terms such as enamel, vitrodentin, fibres, etc.). Recent advances in the knowledge on chondrichthyan enameloid microstructure and data supplied in this work challenge parts of the terminology used so far. Accordingly, several terms must be modified or introduced here; these are summarized in Figure 1.

Overall, chondrichthyan tooth enameloid is composed of two distinct units:

- SCE: 'Single Crystallite Enameloid'. This term was historically used for teeth composed of a rather homogeneous enameloid made of distinct crystallites of random orientation. Although no differences can be observed between this enameloid and the external enameloid of selachimorphs (SLE), different terms

were used. We propose here a unique term (SCE) for both structures. This term is preferred because it more clearly reflects the organization of the crystallites.

- BCE: 'Bundled Crystallite Enameloid'. This new term encompasses the previously used terms TBE and PBE. Both layers exhibit crystallites that aggregate into bundles of varying size and orientation, which led to the creation of two separate terms. Here, PBE and TBE are maintained as an indication of the bundle orientation, although they are grouped under the more generic term BCE to emphasize their interconnection and probable common developmental origin.

Although the SCE is usually rather homogeneous and shows little structural variation, the BCE can show important diversity and complexity. Differences in bundle orientation and/or crystallite organization were so far considered as indicative of different enameloid 'layers'. However, recent observations demonstrate that both bundled enameloid structures (PBE and TBE) are composed of the same bundles, and it was already recognized that the transition between both was progressive. Similarly, it is now acknowledged that radial structures that cross the bundled enameloid originate from the outer SCE, indicating that these units are interconnected. Hence, the term 'layer' appears inappropriate for such intermingled structures and is replaced here by the term 'component'. Three distinct components can be observed within the BCE unit: the existing terms of PBE and TBE, which retain their meaning, as well as the newly created term of RBE: 'Radial Bundled Enameloid'. RBE refers to the radial structures oriented perpendicular to the surface sometimes observed in various taxa. These can form densely arranged bundles, as in selachimorph tooth enameloid, or can be less well defined, as in many hybodont sharks (Cuny *et al.*, 2001).

RESULTS

CTENACANTH ENAMELOID MICROSTRUCTURE

Although histological data are still scarce in comparison with the high Palaeozoic diversity of this group, the enameloid microstructure among ctenacanth teeth appears to show considerable variation. Teeth of *Glikmanius cf. myachkovensis* Lebedev, 2001 (Fig. 2A, B) from the Wordian (Middle Permian) Khuff Formation of Oman (Koot *et al.*, 2013) display a homogenous SCE. This enameloid organization is more homogeneous in appearance than in most hybodonts and is made of very small crystallites never longer than 0.5 µm in random orientation and closely packed together.

A more complex tooth enameloid microstructure was recently described in the ctenacanth *N. flagstaffensis*

Table 1. List of specimens investigated, with information on their locality, age and details of the SEM analysis

Taxon	Family	Locality	Age	Specimen number	Scanning electron microscope	Coating	Acceleration voltage
<i>Hypsobatis weileri</i>	Hypsobatidae	Ben Guerir, C6, Morocco	Maastrichtian	BEG-C6.43	Hitachi S-4800, Institut Européen des Membranes (CNRS, UM2, Montpellier)	Platine	10 kV
<i>Rhombodus binkhorsti</i>	Rhombodontidae	Ben Guerir, C2, Morocco	Maastrichtian	BEG-C2.22	Hitachi S-4800, Institut Européen des Membranes (CNRS, UM2, Montpellier)	Platine	10 kV
<i>Leidybatis jugosus</i>	Myliobatidae	Kpogamé, Togo	Lutetian	KPO 21	Hitachi S-4800, Institut Européen des Membranes (CNRS, UM2, Montpellier)	Platine	10 kV
<i>Pytchotrygon</i> sp.	Ptychotrygonidae	Ait Ben Ali, Morocco	Turonian	ABA 1	Hitachi S-4800, Institut Européen des Membranes (CNRS, UM2, Montpellier)	Platine	10 kV
<i>Belemnobatis</i> sp.	Rhinobatidae	Carniol, France	Aptian	CAR 1	Hitachi S-4000, CRIC (IURC), Université Montpellier II	Gold-Palladium	10 kV
<i>Parapalaeobates</i> cf. <i>atlanticus</i>	Parapalaeobatidae	Imin Tanout, Morocco	Campanian	IMT 1	Hitachi S-4800, Institut Européen des Membranes (CNRS, UM2, Montpellier)	Platine	10 kV
<i>Cretorectolobus</i> sp.	Orectolobidae	Willow Brook, NJ, USA	Maastrichtian	WBR 100	JEOL JSM 6300, Université Montpellier II	Gold-Palladium	15 kV
<i>Paraorthacodus jurensis</i>	Paraorthacodontidae	Mas d'Antrigoule, France	Valanginian	VAL 47,48	JEOL JSM 6300, Université Montpellier II	Gold-Palladium	15 kV
<i>Sphyrna</i> sp.	Sphyrnidae	Taiwan	Recent	REC 146 M	JEOL JSM 6300, Université Montpellier II	Platine	15 kV
<i>Synechodus</i> sp.	Palaeospinacidae	Kolbay, Kazakhstan	Albian	KOB 26	JEOL JSM 6300, Université Montpellier II	Gold-Palladium	15 kV
<i>Nebrius</i> sp.	Ginglymostomatidae	Sidi Chennane, Morocco	Ypresian	SDC 1	JEOL JSM 6300, Université Montpellier II	Platine	15 kV
<i>Squatina</i> sp.	Squatinae	Lespignan, France	Burdigalian	LES 95	JEOL JSM 6300, Université Montpellier II	Platine	15 kV
<i>Pachyhexanchus pockrandti</i>	Crassonotidae	Mas d'Antrigoule, France	Valanginian	VAL 45, 46	JEOL JSM 6300, Université Montpellier II	Gold-Palladium	15 kV
<i>Welcommia bodeuri</i>	Pseudonotidanidae	Mas d'Antrigoule, France	Valanginian	VAL 51	JEOL JSM 6300, Université Montpellier II	Gold-Palladium	15 kV
<i>Heterodontus francisci</i>	Heterodontidae	USA	Recent	–	Philips ESEM	Gold-Palladium	10 kV
<i>Glickmanius</i> cf. <i>myachkovensis</i>	Ctenacanthidae	Oman	Wordian	–	JEOL JSM 6335F, Natural History Museum of Denmark	Gold-Palladium	7 kV
<i>Lissodus minimus</i>	<i>incertae sedis</i>	Brentry, Bristol, UK	Rhaetian	–	Cambridge Stereoscan 250MK3, Department of Earth Sciences, University of Bristol	Gold-Palladium	25 kV
<i>Acrodus spitzbergensis</i>	Acrodontidae	Favret Canyon, Pershing County, NW Nevada	Anisian	–	Cambridge Stereoscan 250MK3, Department of Earth Sciences, University of Bristol	Gold-Palladium	25 kV
<i>Hybodus cloacinus</i>	Hybodontidae	Aust Cliff, UK	Rhaetian	–	Cambridge Stereoscan 250MK3, Department of Earth Sciences, University of Bristol	Gold-Palladium	25 kV
<i>Hybodus plicatilis</i>	Hybodontidae	Bandol, Var department, France	Anisian-Ladinian	–	Cambridge Stereoscan 250MK3, Department of Earth Sciences, University of Bristol	Gold-Palladium	25 kV
<i>Heteroptychodus steinmanni</i>	<i>incertae sedis</i>	Khok Pha Suam, Ubon Ratchathani province, Thailand	Aptian	–	Cambridge Stereoscan 250MK3, Department of Earth Sciences, University of Bristol	Gold-Palladium	25 kV
<i>Asteracanthus</i> sp.	Acrodontidae	Bas-Boulonnais, France	Late Jurassic	–	Cambridge Stereoscan 250MK3, Department of Earth Sciences, University of Bristol	Gold-Palladium	25 kV
<i>Asteracanthus</i> sp.	Acrodontidae	Villers-sur-Mer, Normandie, France	Callovian	–	Cambridge Stereoscan 250MK3, Department of Earth Sciences, University of Bristol	Gold-Palladium	25 kV
<i>Ptychodus</i> sp.	Ptychodontidae	Cap Blanc-Nez, Pas-de-Calais, France	Cenomanian-Turonian	–	Cambridge Stereoscan 250MK3, Department of Earth Sciences, University of Bristol	Gold-Palladium	25 kV
Hybodont dermal denticle	–	Bristol, UK	Rhaetian	–	Cambridge Stereoscan 250MK3, Department of Earth Sciences, University of Bristol	Gold-Palladium	15 kV

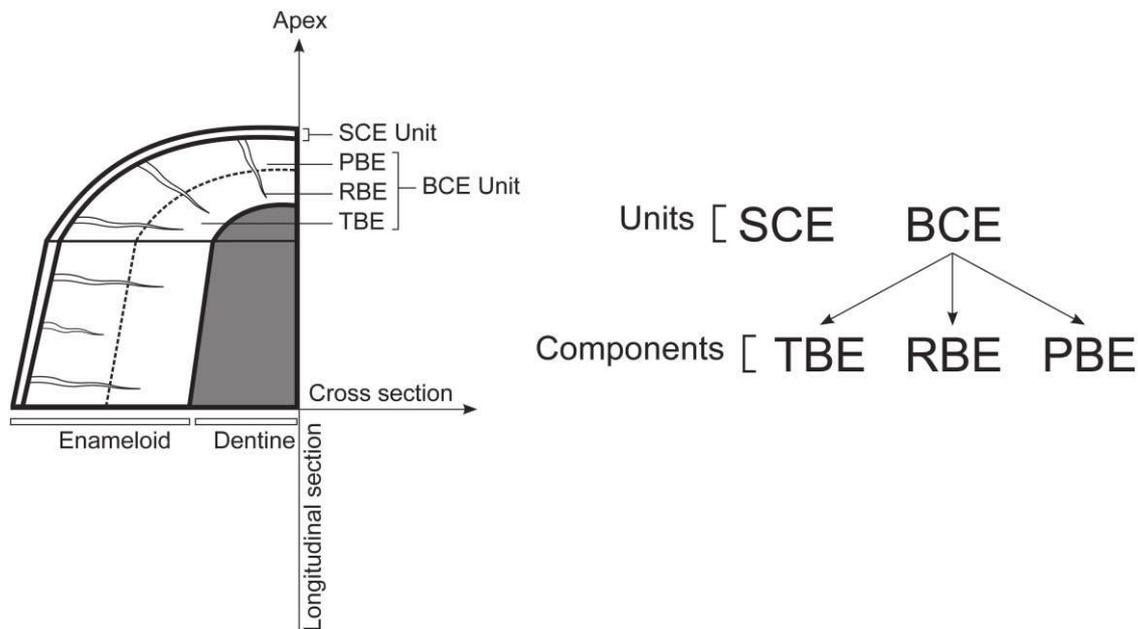


Figure 1. Schematic organization of a typical selachimorph tooth illustrating the various tissues composing the enameloid cover.

from the mid-Permian of Arizona (Guinot *et al.*, 2013). Below a thick SCE, loosely packed bundles of crystallites oriented apicobasally are observed, except near the cutting edges where they become normal to the cutting edge axis. This change in orientation occurs relatively far from the cutting edges (in comparison with selachimorphs) and the labial folds studied are composed of SCE.

HYBODONT ENAMELOID MICROSTRUCTURE

The main features of the hybodont enameloid microstructure include a high degree of homogeneity, without well-separated units, and there is a tendency for the main structures of the tissue to be oriented perpendicular to the surface of the crown (Fig. 2C). In most cases, this enameloid can be separated into two units (Fig. 2D). The external SCE unit is quite dense and homogeneous, with crystallites showing no preferential orientation. The latter aspect is particularly marked in surface observations (Fig. 2E). The internal part of the tissue shows a tendency for the crystallites to form short bundles oriented perpendicular to the surface, thus representing the RBE component of the BCE unit, usually loosely defined in hybodonts. In hybodonts possessing rather high-crowned teeth, such as *Hybodus plicatilis* Agassiz, 1843 (Fig. 2F), the enameloid is more homogeneous with a clear tendency for the crystallites to be oriented perpendicular to the surface. The same trend can be observed in hybodonts developing a cutting dentition (Duffin & Cuny, 2008). No special features

are observed in the enameloid microstructure of longitudinal ridges and cutting edges, only a thickening of the tissue.

In hybodont sharks that developed a grinding dentition with large, flat teeth, such as *Asteracanthus* Agassiz, 1837 and *Heteroptychodus* Yabe & Obata, 1930, the enameloid appears to intermingle with the dentine and dentinal tubules are seen penetrating into the enameloid (Fig. 2G, H). In between the tubules, the enameloid appears to be organized into short, coarse, interwoven bundles (Fig. 2I). However, the orientation of the individual crystallites in each bundle is not as parallel to each other as can be seen in selachimorph enameloid (Fig. 2J). A similar microstructure was also found in the teeth of *Asteracanthus* (Bendix-Almgreen, 1983). Andreev (2011) considered that this interwoven tissue was not a true enameloid as a result of the presence of bundles. In *Asteracanthus*, the compact external unit of the enameloid is probably very thin and wears off quickly but it appears thicker in *Heteroptychodus*. In Triassic *Acrodus* Agassiz, 1838, a component with interwoven bundles is present between an outer SCE and the inner part of the enameloid showing dentinal tubules penetrating the tissue (Fig. 2D). The enameloid microstructure of *Ptychodus* Agassiz, 1839 teeth appears to be quite similar to that of *Asteracanthus* (Bendix-Almgreen, 1983), including dentinal tubules that penetrate the enameloid (Fig. 2K). The texture of the enameloid in between the tubules is also quite similar to that observed in *Asteracanthus*, with irregular coarse bundles made of randomly

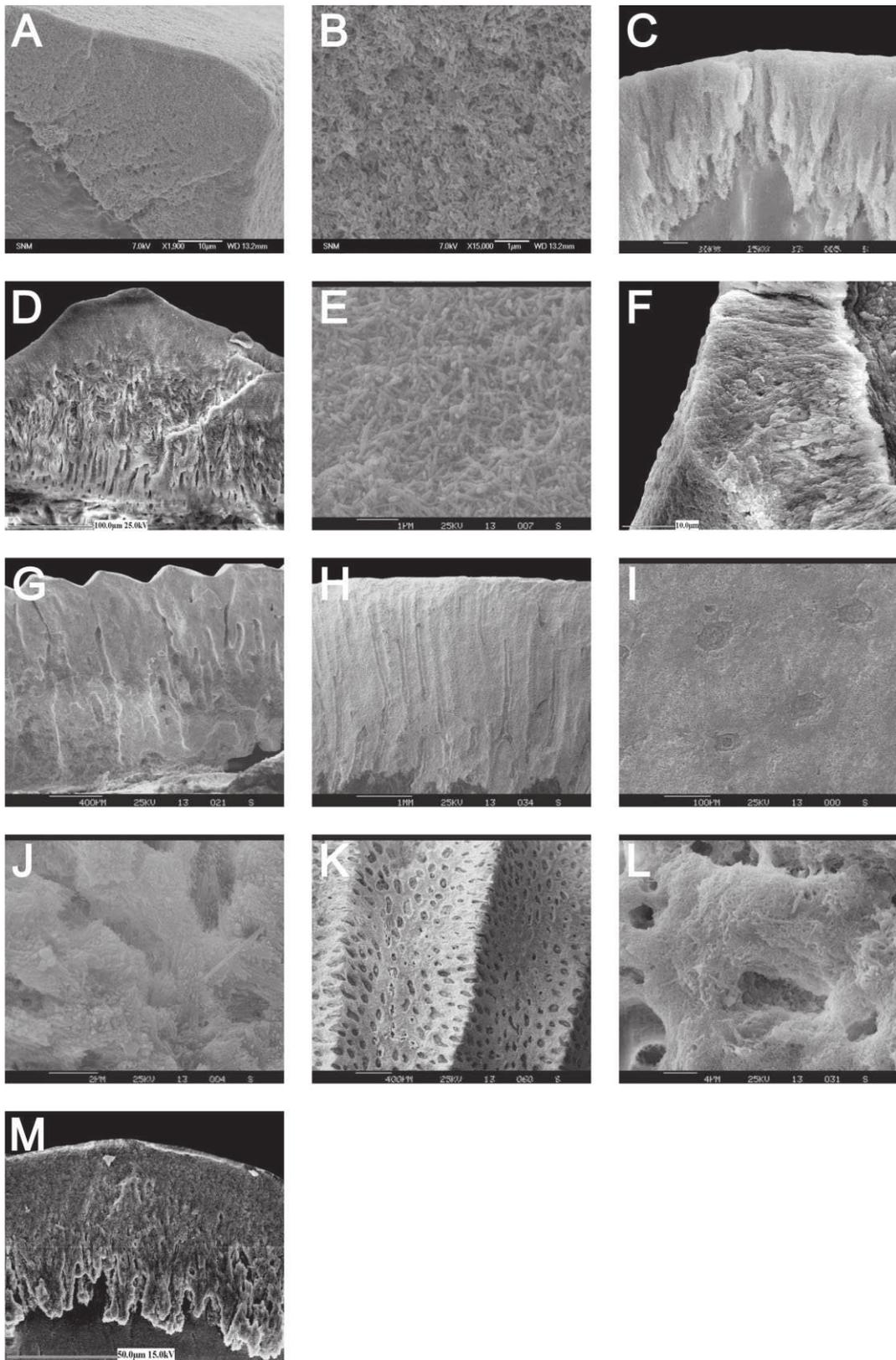


Figure 2. Ctenacanthiformes and Hybodontiformes enameloid. A, B, enameloid microstructure of *Glikmanius cf. myachkovensis* etched 5 s in 3.7% HCl. A, view of the enameloid at the level of a fracture of the tooth. B, details of the SCE on the same fracture. C, enameloid microstructure at the level of a longitudinal fracture of a tooth of *Lissodus minimus*. Etching: 30 s in 10% HCl. D, longitudinal fracture of a tooth of *Acrodus spitzbergensis* at the level of the main cusp etched 2 min 5 s in 10% HCl. See the inner bundles of the RBE and the more homogeneous external SCE. E, Surface of a tooth of *Hybodus cloacinus* etched 30 s in 10% HCl. F, Transverse fracture of a tooth of *Hybodus plicatilis* at the level of an ornamentation ridge. Etching: 10 s in 10% HCl and cleaning in acetone for 10 min. G, Transverse fracture of a tooth of *Heteroptychodus steinmanni* etched 1 min 35 s in 10% HCl. H, Transverse fracture of a tooth of *Asteracanthus* sp. etched 6 min 30 s in 10% HCl. I, J, surface of a tooth of *Asteracanthus* sp. etched 5 s in 10% HCl. K, L, Surface of a tooth of *Ptychodus* sp. etched 23 min 35 s in 10% HCl. M, Longitudinal section of a hybodont dermal denticle etched 5 s in 10% HCl.

oriented crystallites (Fig. 2L). The absence of well-defined bundles argues against *Ptychodus* being a lamniform shark as previously proposed (Hamm, 2010), although its exact phylogenetic relationships are still debated. Although calcified vertebrae, an autapomorphy of neoselachian sharks, have been found in association with dentition of *Ptychodus* (Stewart, 1980; Everhart & Caggiano, 2004), no specimen in connection has been recovered so far and it is not possible to certify they indeed belong to the same animal (Welton & Zinsmeister, 1980). Moreover, as noted by Cappetta (2012), it cannot be excluded that calcified centra appeared convergently in very large hybodonts such as *Ptychodus*. As a result, the systematic position of *Ptychodus* cannot be determined with certainty in the present state of our knowledge (Shimada, 2012), although the similarities between its enameloid microstructure and that of *Asteracanthus* may indeed favour a close relationship between *Ptychodus* and Hybodontiformes (Cuny, 2008; Shimada, 2012).

SELACHIMORPH ENAMELOID MICROSTRUCTURE

Sharks (selachimorphs) are the best represented chondrichthyan group among dental enameloid microstructure studies, although most taxa were explored on the basis of surface etchings (Reif, 1973; Preuschoft *et al.*, 1974). However, the number of taxa analyzed in the literature remains very low compared to the overall taxonomic diversity of this group (including modern and fossil taxa) and the tooth enameloid microstructure of the vast majority of shark families remains to be explored. Although the 'triple-layered' enameloid is characteristic of shark teeth, this apparent conservative structure appears to be absent in basal selachimorphs (Andreev & Cuny, 2012) and the 'triple-layered' enameloid of derived shark teeth is complexified by a number of additional structures (Cuny & Risnes, 2005; Guinot & Cappetta, 2011), which are summarized below.

The 'triple-layered' enameloid

Two units (Fig. 3A) were identified in shark enameloid: (1) the SCE, a thin outer unit made of distinct and

randomly oriented crystallites; (2) the BCE, composed of the three previously discussed components: the PBE, an intermediate component made of crystallites associated into bundles that are oriented parallel to each other and to the crown surface but change orientation near the cutting edge where they are aligned normal to its axis (Fig. 3B); the TBE, an inner component made of randomly-oriented bundles of crystallites; and the RBE, composed of radial structures sometimes forming densely arranged bundles. The SCE/BCE boundary is often well marked and although these units are not independent (see below) it led some authors to suggest they are developmentally decoupled (Andreev & Cuny, 2012). This enameloid organization is common among derived sharks, with the only exception known to date being the lateral grinding teeth of representatives of the genus *Heterodontus* Blainville, 1816 in which the PBE is lacking whereas anterior clutching teeth retained the classic selachimorph enameloid structure (Reif, 1973) (Fig. 3C, D). A lack of component is also known to occur among early representatives of the Selachimorpha (*Palaeospinax* sp.; *Rhomaleodus*, '*Synechodus*' *volaticus* Johns, 1997; *Mucrovenator*, *Reifa* Duffin, 1980) in which the internal TBE is absent (Andreev & Cuny, 2012). Another common pattern within shark enameloid microstructure is the complexification of the enameloid structure along the crown height. This was observed among several shark taxa (*Rhomphaiodon minor*: Agassiz, 1837; *Paraorthacodus jurensis*: Schweizer, 1964) where the PBE and TBE appear merged at the base of the crown and differentiate towards the upper half of the cusp (Cuny & Risnes, 2005; Guinot & Cappetta, 2011). Similarly, a base-to-apex variation in microstructure was reported in the SCE of *P. jurensis* teeth (reported as *Paraorthacodus* sp. in Guinot & Cappetta, 2011). More generally, all components appear better developed and thicker toward the apex of the crown (Fig. 3A).

Radial structures

Radial structures are commonly encountered in derived selachimorph tooth enameloid but their organization has received little attention. Among these, radial

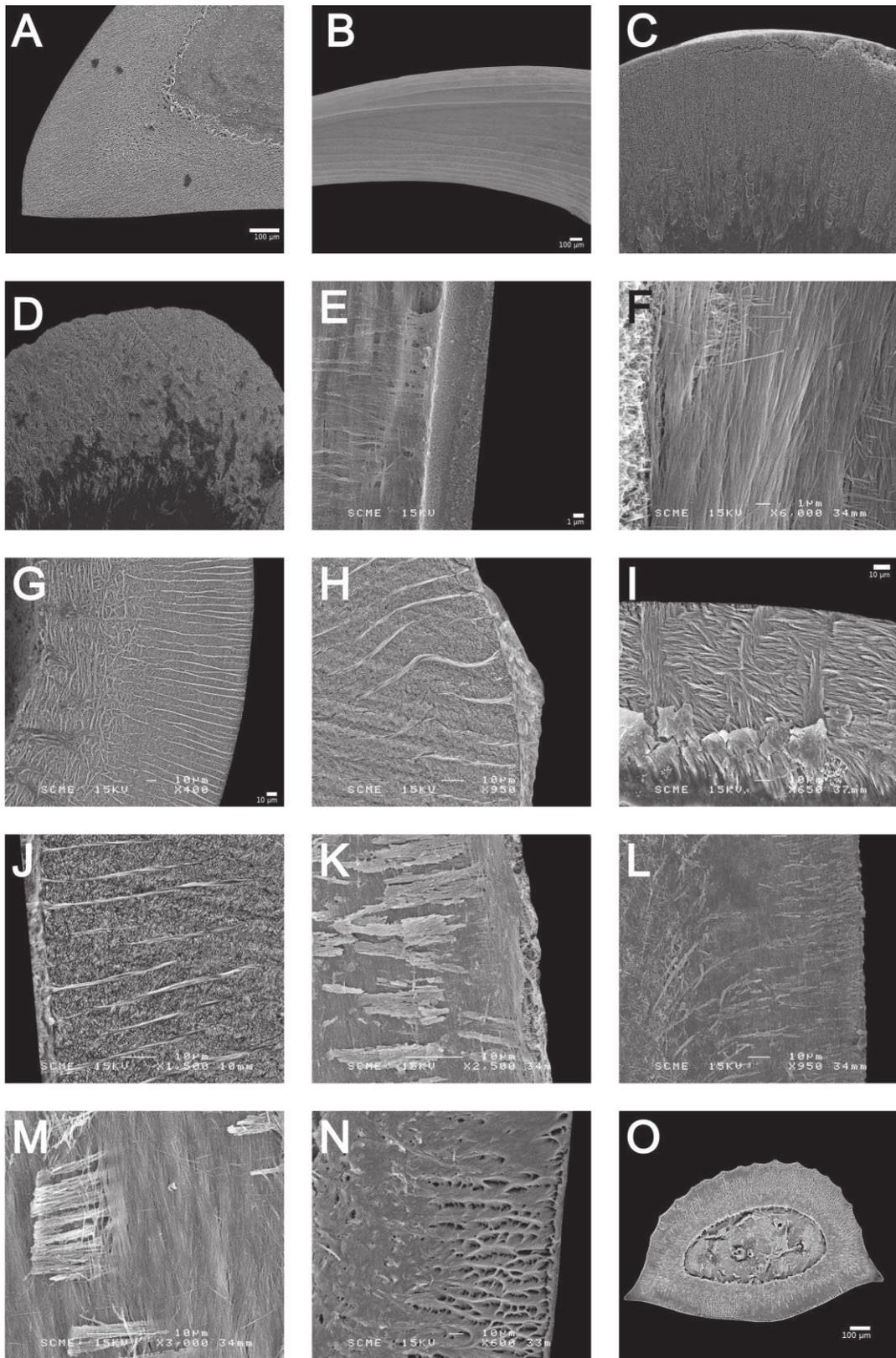


Figure 3. A, *Cretorectolobus* sp., general view of the crown apex, longitudinal section etched 5 s in 10% HCl. B, *Paraorthacodus jurensis*. Surface view of the PBE etched 10 s in 10% HCl. C, D, *Heterodontus francisi*, transverse section etched 45 s in 0.1% HNO₃. C, Lateral tooth lacking the PBE. D, Anterior tooth made of the PBE and TBE components. E, *Paraorthacodus jurensis*. Loose Radial Bundles originating from the SCE, longitudinal section etched 5 s in 10% HCl. F, *Pachyhexanchus pockrandti*, Loose Radial Bundles originating from the SCE, longitudinal section etched 5 s in 10% HCl. G, *Sphyrna* sp., Thick Radial Bundles crossing the PBE and penetrating into the TBE, transverse section etched 5 s in 10% HCl. H, *Synechodus* sp., cutting edge with corrugated Thick Radial Bundles crossing the PBE, transverse section etched 5 s in 10% HCl. I, *Nebrius* sp., Thick Radial Bundles crossing perpendicularly the parallel bundles of the PBE, longitudinal section etched 5 s in 10% HCl. J, *Synechodus* sp., Thick Radial Bundles crossing the PBE and originating from the SCE, transverse section etched 5 s in 10% HCl. K, L, *Welcommia bodeuri*, longitudinal section etched 5 s in 10% HCl. K, planar amalgamated crystallites crossing the PBE perpendicularly. L, planar amalgamated crystallites crossing the PBE perpendicularly and diving basally when penetrating the TBE. M, *P. pockrandti*, planar amalgamated crystallites crossing the PBE perpendicularly; longitudinal section etched 5 s in 10% HCl. N, O, *P. jurensis*, transverse section etched 5 s in 10% HCl. N, radial furrows in the PBE. O, *P. jurensis*, general view showing radial furrows in the PBE and cavities near the PBE/SCE boundary.

crystallites (referred to as loose radial bundles in Guinot & Cappetta, 2011) frequently occur in shark teeth and consist of crystallites that originate from the SCE and run perpendicularly through the superficial part of the PBE (Fig. 3E, F). Because these crystallites are not densely arranged, radial crystallites are sometimes difficult to observe but it is likely that their absence is an etching artefact comparable to that observed for the SCE unit. Radial crystallites can also form densely arranged bundles (referred to as thick radial bundles in Guinot & Cappetta, 2011) that are more easily observed in transverse sections (Fig. 3G, H) but are also seen in longitudinal sections (Fig. 3I). Similar to the loose radial crystallites, radial bundles originate from the SCE (Fig. 3J) and cross the PBE perpendicularly where they aggregate into bundles. In most taxa explored so far, bundles become thinner as they cross the PBE and fade out in this component. Some taxa show radial bundles that penetrate further into the TBE (Fig. 3G) and hence the bundles are also part of this component. Thick radial bundles are most frequently rectilinear and oriented normal to the crown surface in transverse section. Nevertheless, some taxa exhibit corrugated thick radial bundles at the level of the cutting edges, from which they originate (Fig. 3H), whereas the remaining radial bundles originate from the SCE. Thick radial bundles are found in diverse shark groups such as Paraorthacodontidae (Cuny & Risnes, 2005); Sphyrnidae, and Ginglymostomatidae (present study); Agaleidae (Rees & Cuny, 2007); Palaeospinacidae (Guinot & Cappetta, 2011); Odontaspidae and Chlamydoselachidae (Reif, 1973; Gillis & Donoghue, 2007); and Hexanchidae, Lamnidae, and Carcharhinidae (Reif, 1973). However, thick radial bundles are part of the intrageneric variation because they are not consistently present in representatives of a given genus: compare *Paraorthacodus eocaenus* Leriche, 1902 of Cuny & Risnes (2005) and *Paraorthacodus* sp. (= *P. jurensis*, see Guinot, Cappetta

& Adnet, 2014) of Guinot & Cappetta (2011) or *Synechodus rhaeticus* (Duffin, 1982) of Cuny & Risnes (2005) and *Synechodus* sp. of Guinot & Cappetta (2011). Alternatively, this may indicate different generic relationships for these taxa.

Another category of radial structures is represented by what was referred to as planar amalgamated crystallites (Guinot & Cappetta, 2011). These are composed of thick crystallites that are not arranged into bundles but rather aligned parallel to each other and almost merged together (Fig. 3K). Such structures can reach lengths of 50 µm and a maximum width of 4 µm and commonly originate in the PBE, close to the PBE/SCE boundary. The planar amalgamated crystallites cross the bundles of the PBE perpendicularly with a slight basal incline, changing to a steep basal descent when penetrating the TBE (Fig. 3L). These structures were best observed in *Welcommia bodeuri* Cappetta, 1990 (Pseudonotidanidae) but have also been reported from paraorthacodontid and fossil hexanchid species (Guinot & Cappetta, 2011). In the latter (*Pachyhexanchus pockrandti*; Ward & Thies, 1987), the crystallites appear less densely merged and the radial structures appear much shorter and wider as well as restricted to the inner half of the PBE and they are absent from the TBE (Fig. 3M).

The third group of radial elements is represented by radial depressions that run through the PBE and are seen in cross-section (Fig. 3N). These so-called radial furrows are irregularly present in cross-sections and originate at the PBE/SCE boundary and occupy most of the thickness of the PBE component. Radial furrows are often found associated with cavities that are situated at the PBE/SCE boundary and consist of depressions located between the bundles of the PBE (Fig. 3O). It is unclear whether furrows and cavities are vestigial features of dissolved organic elements or genuine structures that lighten the hypermineralized tissue. Alternatively, these might simply be the aspect in

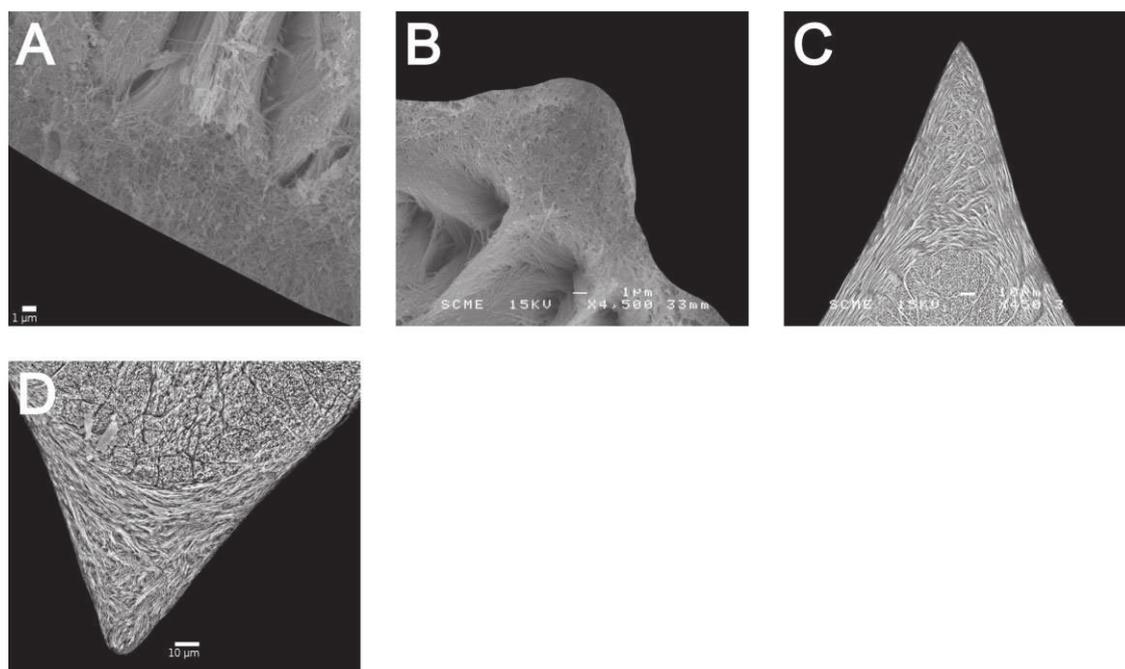


Figure 4. Selachimorpha enameloid. A, *P. pockrandti*, radial furrows near the SCE, transverse section etched 5 s in 10% HCl. B, *P. jurensis*, lingual ornament made of SCE, transverse section etched 5 s in 10% HCl. C, *Sphyrna* sp., cutting edge showing bundles of the PBE oriented normal to the axis of the cutting edge, transverse section etched 5 s in 10% HCl. D, *Squatina* sp., cutting edge showing bundles of the PBE oriented normal to the axis of the cutting edge, transverse section etched 5 s in 10% HCl.

cross-section of the loose radial bundles that irregularly originate from the SCE (creating cavities) and cross the PBE (creating the furrow margins) (Fig. 4A).

Cutting edges and crown ornaments

A variety of crystallite organizations has been described in the literature for cutting edges and crown ornaments and all of them involve the SCE unit and/or parallel bundles. Crown ornaments that are often encountered on the surface of shark teeth, such as vertical parallel ridges, are typically composed of individual crystallites with a random orientation (Fig. 4B), although an alternative composition consisting of a simple folding of the surface of the PBE was reported in *Striatolamia macrota* (Agassiz, 1843) (Cuny & Risnes, 2005). Similarly, many taxa exhibit cutting edges exclusively made of bundles of the PBE component oriented normal to the axis of the cutting edge (Fig. 4C, D). Other taxa such as *R. minor* seem to display a combination of both structures with an external unit made of randomly oriented crystallites and an internal unit made of parallel bundles, although this organization is lost in the lower parts of the crown where only a SCE is found (Cuny & Risnes, 2005). This combined composition was also tentatively reported from the cutting edges of *W. bodeuri* (Guinot & Cappetta, 2011). Structures associated with the ornamentation

ridges such as the one found in *Rhomphaiodon nicolensis* Duffin, 1993 and with the cutting edges of most selachimorphs were termed RCEL (Ridges/Cutting Edge Layer) by Cuny & Risnes (2005) and tentatively associated with the 'SLE layer'. This hypothesis does not fit the present reappraisal of chondrichthyan enameloid microstructure. The well-marked boundary between the bundled part of the RCEL and the PBE is likely to be an artefact as a result of the change of orientation of the bundles, and the lower part of the RCEL belongs to the BCE, not the SCE ('SLE') unit, as first supposed by Cuny & Risnes (2005).

BATOMORPH ENAMELOID MICROSTRUCTURE

Batomorph enameloid is very poorly known, and several taxa were recently shown to possess a more complex enameloid microstructure than previously described (Cappetta, 2012; Enault *et al.*, 2013). Here, we describe for the first time the enameloid microstructure of several taxa in order to emphasize the diversity of enameloid microstructures that can be found within the batomorphs.

Hypsobatis weileri Cappetta, 1992

Teeth of this species exhibit a high crown of roughly hexagonal shape in occlusal view. In longitudinal section,

most of the crown is occupied by dentine, covered by a thin enameloid layer, an arrangement similar to that found in some durophagous stingrays with very high crowns (Enault *et al.*, 2013), although hyspopatids are rhinobatoids (Cappetta, 2012). The enameloid layer appears to be a single SCE unit not exceeding 95 μm in thickness along the entire occlusal surface of the tooth (Fig. 5A). The SCE thickness is relatively constant over most of the crown, thinning only at the edges, and apparently extending further down on the labial than on the lingual crown face. It should be noted that dental wear has likely reduced its thickness on the occlusal surface, which is an issue that could largely be avoided by selecting teeth from the back of the jaw, although this is not possible with (isolated) fossil material. The enameloid is composed of individual crystallites averaging 0.8 μm in length and exhibiting an overall random orientation. The size and shape of the crystallites do not vary across the enameloid layer, although a slight preferential orientation is noticeable in the inner half of its thickness. Here, the crystallites appear to be loosely oriented normal to the surface of the crown (Fig. 5B). In the outer half of the enameloid thickness, however, crystallites display a completely random orientation. Transition from crystallites with a preferential orientation to randomly arranged crystallites is very gradual and progressive, which is quite similar to what can be observed in many hybodonts. The limit between the enameloid cover and the underlying dentine is not well defined and numerous thin dentine tubules (2.5–4 μm long) extend into the enameloid cover.

Rhombodus binkhorsti Dames, 1881

Teeth are robust with a high crown and nearly flat occlusal surface. In section, the general enameloid organization is similar to that of *H. weileri* with most of the tooth consisting of dentine, capped by a thin enameloid layer. The enameloid has a mean thickness of 125 μm (Fig. 5C). As observed in *H. weileri*, this thickness is relatively constant over the occlusal surface but decreases towards the edges, and also appears to be more important on the labial face of the crown than on its lingual face. The boundary with dentine is also loosely defined, with small tubules of dentine penetrating superficially into the enameloid layer.

The enameloid comprises an SCE unit, entirely composed of rod shaped crystallites showing no preferential orientation (Fig. 5D). Unlike *H. weileri*, no difference could be observed between the inner and outer parts of the enameloid cover, which is homogeneous across its entire thickness. The crystallites are stubby and have a mean length of 0.6 μm . Observations performed on other *Rhombodus* species have yielded similar results (S. Enault, pers. observ.).

Leidybatis jugosus (Leidy, 1876)

The specimen studied here is a median tooth, wider than long, with an elevated central area and convex occlusal surface. The enameloid cover appears thick and granular in texture. Section studies reveal a sole SCE unit, which is thicker in the central area, reaching 150–200 μm . The enameloid cover is thinner laterally, as well as on the lingual and labial edges and thus does not appear to form a regular covering of the crown.

The enameloid cover is virtually absent in some areas of the crown, which is probably a result of normal dental wear during predation. The enameloid–dentine boundary does not exhibit a sharp transition and dentine tubules extend far into the enameloid layer. This results in thick enameloid ‘pillars’ that do not appear to connect with the rest of the hypermineralized layer (Fig. 5E). Curiously, patches of dentine appear to be fully enclosed within the enameloid layer (arrows). It is clear that the SCE of this taxon is made of a homogenous layer of randomly oriented crystallites, showing no preferential orientation throughout its thickness and displaying the usual rod-shape morphology. However, the crystallites are overall smaller than in the previously discussed taxa, and have a mean length of 0.4–0.5 μm .

Belemnobatis sp.

Teeth of this species are wider than long, with a well-marked transverse crest. The labiolingual longitudinal sections were positioned to pass through both the crest and uvula.

The enameloid layer is thick, and the boundary with the dentine is sharp and irregular. Its maximum thickness of 68 μm is observed in the transverse crest area. It thins down progressively over the apron and uvula. On the lingual and labial crown faces, the enameloid layer appears to be made of two identifiable units (Fig. 5F). The outer unit is composed of short bundles of crystallites that are approximately 3.5 μm long and 2 μm thick. Both the short bundles and the individual crystallites show a preferential orientation perpendicular to the labial and lingual sides of the crown but tend to lose this preferential orientation toward the transverse crest area. As a result of the presence of bundles, this unit qualifies as a BCE. The inner part of the enameloid cover is made of very poorly defined RBE, similar to what can be observed in some hybodont taxa. The crystallites are approximately the same dimension as those forming short bundles in the outer part. The transverse crest area displays a more complex microstructure (Fig. 5G). The short crystallite bundles composing the outer part of the enameloid layer tend to lose their preferential orientation and instead appear somewhat interwoven and chaotic. The bundles are oriented towards the apex of the transverse crown, thus

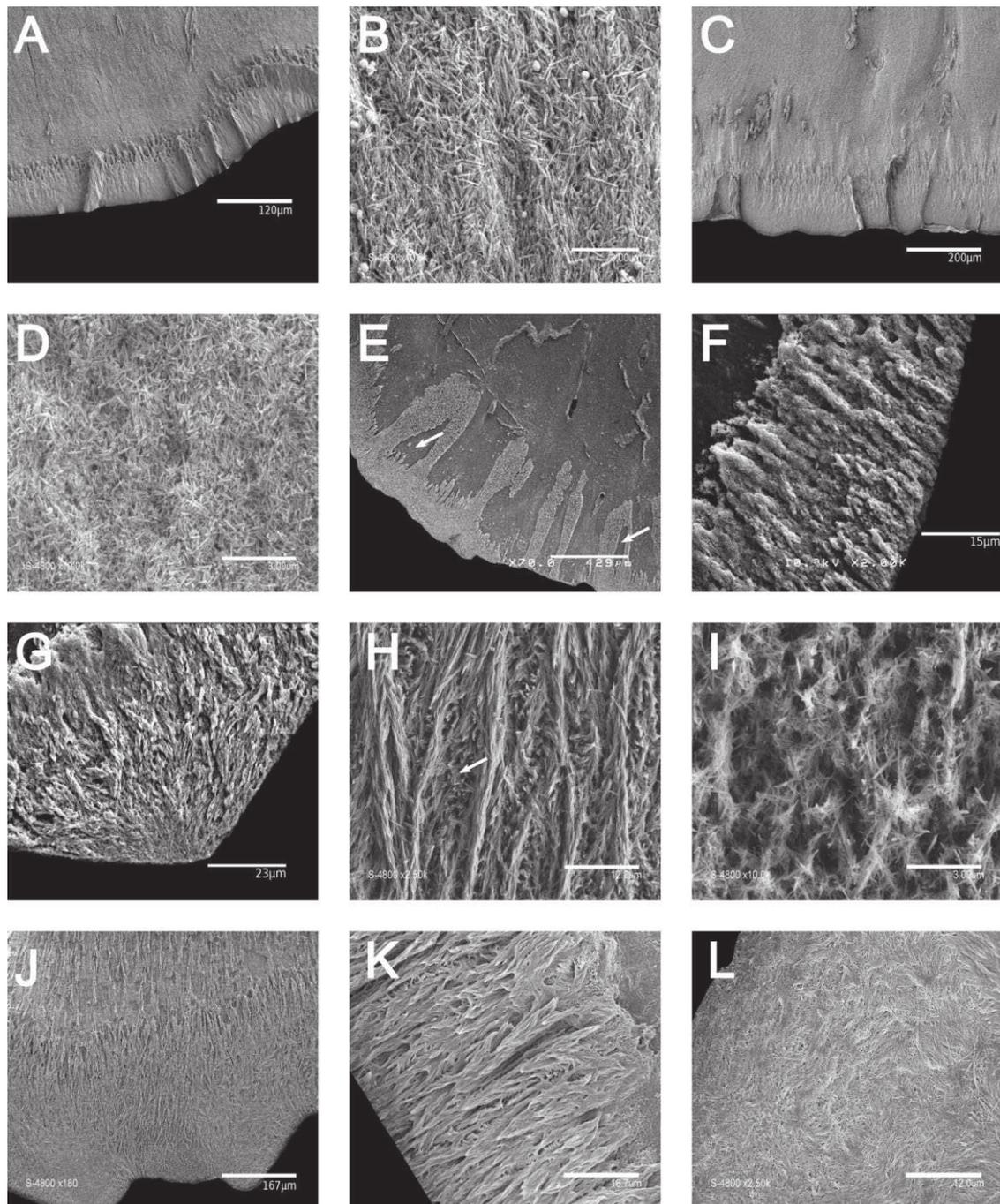


Figure 5. Batomorphii enameloid. A, B, *Hypsobatis weileri*, transverse section etched 5 s in 10% HCl. A, general view of the thin SCE. B, inner part of the enameloid layer, with crystallites showing a slight preferential orientation normal to the occlusal surface. C, D, *Rhombodus binkhorsti*, transverse section etched 5 s in 10% HCl. C, general view of the thin SCE. D, detail of the SCE. E, *Leidybatis jugosus*, transverse section etched 5 s in 10% HCl. SCE forming thick pillars extending far into the dentine layer, with patches of dentine fully enclosed in the enameloid (arrows). F, G, *Belemnobatis* sp., transverse section etched 5 s in 10% HCl. F, enameloid on the lingual face of the crown. G, detail of the enameloid layer at the level of the transverse crest. H, I, J, *Parapalaebates* cf. *atlanticus*, transverse section etched 5 s in 10% HCl. H, enameloid microstructure showing the RBE. I, detail of the randomly oriented crystallites forming the outer SCE. J, general view of the enameloid at the level of the crown ornamentation. K, L, *Ptychotrygon* sp., transverse section etched 5 s in 10% HCl. K, detail of the RBE. L, detail of the SCE.

sometimes becoming almost parallel to the crown surface. The inner portion of the enameloid exhibits the same microstructure as the rest of the crown. The apex is covered by a third structure, made of small (0.5 µm long) tightly packed rod-shaped crystallites showing no preferential orientation. Both its structure and location are reminiscent of the RCEL that forms the cutting edges in some shark teeth.

Parapalaeobates cf. atlanticus Arambourg, 1952

The specimens sampled for enameloid microstructure are median teeth, which are wider (mesiodistally) than long (labiolingually). The oral face of the crown is heavily ornamented, and the transverse crest is poorly marked. These teeth display the most complex microstructure of all the batomorph taxa examined in the present study (Fig. 5H). The enameloid layer is very thick, approximately 290 µm, and composed of at least two distinct units. The outermost unit consists of well-individualized crystallites (approximately 1 µm in length) displaying a completely random orientation comparable to the reduced SCE unit of neoselachian sharks but much thicker, reaching over 80 µm in some places (Fig. 5I). The precise thickness and distribution of this unit on the tooth crown is difficult to estimate because of dental wear but it appears especially associated with the ornamentation of the occlusal face of the crown. Conversely, the inner BCE unit exhibits a highly structured morphology. In the inner part of the enameloid layer, close to the dentine, the rod-shaped crystallites (1 µm) tend to aggregate into long bundles arranged normal to the occlusal surface of the crown. On the basis of selachimorph enameloid terminology, these are radial bundles of crystallite. These bundles are crossed by other bundles (arrows), which are arranged parallel to the occlusal crown surface (thus exhibiting close similarities with the selachimorph PBE), resulting in a highly structured lattice pattern. Toward the top of the BCE, and before reaching the SCE unit, the radial bundles lose their normal orientation and display an interwoven pattern (Fig. 5J). The transition with the underlying dentine is well defined, with numerous dentine tubules extending into the base of the enameloid layer.

Ptychotrygon sp.

This genus exhibits broad teeth with a high crown, a prominent apron and a well-marked transverse crest as well as a number of labial ridges. The enameloid layer is well developed, reaching its maximum thickness at the transverse crest and labial ridges in longitudinal section, where it reaches at least 170 µm. It then thins quickly on the lingual and labial sides over the apron and uvula, which are not completely covered by enameloid. The enameloid microstructure of this taxon is similar to some extent to that of *P. cf. atlanticus*.

Indeed, through most of the enameloid cover, the crystallites form well-defined bundles oriented normal to the surface (Fig. 5K). These radial bundles are crossed by smaller bundles which appear to be oriented parallel to the occlusal surface of the crown, as seen in *Parapalaeobates cf. atlanticus*. The rod-shaped crystallites are long (approximately 1.5 µm) and tightly packed. On the thickest parts of the crown, (i.e. transverse crest and labial ridges), the bundles closest to the surface tend to lose their normal orientation and display a somewhat interwoven morphology until they completely lose any visible organization. Closer to the occlusal surface, the crystallites are slightly shorter (1–1.2 µm) and have lost both their bundle organization and preferential orientation (Fig. 5L).

DISCUSSION

THE HYPERMINERALIZED COVER OF SKATES AND RAYS
Batomorph tooth enameloid had received little attention for a variety of reasons. It was noted that they appeared to lack the ‘triple-layered’ enameloid characteristic of selachimorph sharks (Preuschoft *et al.*, 1974; Thies, 1982). Instead, they were assumed to possess a single layer of enameloid made either of SCE (Reif, 1977; Cuny *et al.*, 2009) or TBE (Gillis & Donoghue, 2007). This single layer was considered to be a mechanical adaptation to a durophagous diet (Preuschoft *et al.*, 1974; Botella *et al.*, 2009), somewhat neglecting that batomorphs exhibit almost the same variety of feeding habits as sharks, with the exception of megacarnivory (Dean, Wilga & Summers, 2005). This single-layered enameloid was considered a derived character of batomorphs by Underwood (2006), which is probably the result of a misinterpretation of the dental histology of certain taxa (Cuny *et al.*, 2009). Alternatively, Cuny *et al.* (2009) considered that it was more parsimonious for batomorphs to have retained a plesiomorphic enameloid microstructure, based on the fact that the successive sister groups of the Neoselachii possess a single layer of SCE (Reif, 1973; Gillis & Donoghue, 2007). This hypothesis is challenged here, given new data on batomorphs, stem chondrichthyans, and hybodonts.

The results of the SEM investigation of batomorph teeth reveal that some of them exhibit a much more diverse and complex enameloid microstructure than previously assumed and that the statement that batomorph teeth only possessed a SCE (or TBE) was erroneous. It is surprising that the oldest specimen sampled here, *Belemnobatis sp.*, already possesses a complex dental histology, an observation which is also true for other ancient batomorph taxa such as the Archaeobatidae (S. Enault, pers. observ.). We sampled members of two out of the three batomorph orders:

Rajiformes and Myliobatiformes, as a result of the unavailability of Torpediniformes fossil material. The Rajiformes exhibit the most marked disparity in enameloid microstructure, from the very simple SCE of *H. weileri*, the more complex microstructure of *Belemnobatis* sp. to the highly complex and structured microstructures of *Ptychotrygon* sp. and *P. cf. atlanticus*. Conversely, all sampled Myliobatiformes exhibit a classical SCE without any sign of preferential orientation or additional units. This observation is confirmed by the microstructural investigation of a number of other myliobatiforms and contradicts some of the observations of Enault *et al.* (2013), such as the description of two distinct layers in the enameloid of some myliobatiforms as a result of the poor resolution of some SEM micrographs.

Hypsobatis weileri and *Rhombodus* sp. display an SCE unit consistent with the traditional view of batomorph enameloid. This is also the case for *L. jugosus*, which display a thick SCE, forming pillars that are completely interlocked with the underlying dentine. This organization, although fitting the classical idea of a 'single-layered' SCE in batomorph, is nonetheless extremely peculiar, and hints at many developmental questions that will need further investigation. In some areas, patches of dentine even become included within the enameloid cover, and further analysis on extant models might help to determine the role of odontogenetic cells in such an unusual organization of the dental hard tissues.

The enameloid microstructure observed in *Belemnobatis* sp. is unexpected because Cuny *et al.* (2009) studied the surface microstructure of a *Belemnobatis aominensis* Cuny, Srisuk, Khamha, Suteethorn & Tong, 2009 specimen from the upper Middle Jurassic of Thailand that exhibited an SCE made up of small rod-shaped crystallites. However, the present study suggests a more complex organization of the hard tissues, especially in the transverse crest area, which are strongly reminiscent of the RCEL observed in several shark taxa (Cuny & Risnes, 2005). This could hint at a high diversity in enameloid microstructure in this genus, or it may highlight the difficulty in recognizing the structure of the outer parts of the enameloid using surface etching because no sections were made by Cuny *et al.* (2009). It should also be noted that the tooth studied by Cuny *et al.* (2009) was etched for a rather long time (70 s), which might have completely removed the outer part of the enameloid. Furthermore, these results might also suggest a high diversity of enameloid microstructures within genera with long stratigraphic ranges, which is true not only for *Belemnobatis*, but also for *Synechodus* and *Paraorthacodus* for example, as previously noted (Guinot & Cappetta, 2011). *Ptychotrygon* sp. and *Parapalaeobates cf. atlanticus* exhibit the most complex enameloid mi-

crostructure of all batomorphs sampled in the present study. Although showing a few differences, their enameloids are overall very similar, exhibiting a thick inner BCE unit consisting of well-developed bundles oriented normal to the surface, which tend to lose their preferential orientation toward the surface of the crown, and a superficial SCE unit completely lacking microstructural differentiation. Thus, radial structures were found in all the groups investigated here (except for the ctenacanth), even if they appear to exhibit a high degree of variability. The RBE observed in *Parapalaeobates* and *Ptychotrygon* also appears very similar to the enameloid microstructure observed at the base of the crown in *Synechodus* sp. (Guinot & Cappetta, 2011) (Fig. 5E).

Following the hypothesis of Cuny *et al.* (2009), it is indeed more parsimonious to consider that batomorphs retained a plesiomorphic state of enameloid microstructure rather than it being a reversion from the three-layered state. This feature was never documented in any batomorphs so far, although very few taxa were investigated until now. In most batomorphs, the main orientation of the enameloid structure is set perpendicular to the surface of the crown, as in hybodont sharks, which is also likely to be a plesiomorphic characteristic. Furthermore, the results obtained in the present study and the data obtained from other investigated taxa suggest that a highly simplified SCE unit, lacking microstructural differentiation, could be a derived character of the Myliobatiformes. However, as demonstrated by the wide range of microstructures described in the present study, many questions remain unanswered, and the full extent of the diversity and variability of batomorph tooth histology remains to be fully evaluated in both extant and extinct taxa. The possible impact of the feeding habits on the enameloid layer also remains to be evaluated by sampling other taxa exhibiting very specialized diets among selachimorphs and batomorphs. This would allow the distinction between possible phylogenetic and adaptive signals of certain histological and microstructural characters.

CHONDRICHTHYAN ENAMELOID EVOLUTION

Several obstacles have hampered our ability to gain a global understanding of the evolution of chondrichthyan enameloid. These obstacles include poor preservation of Palaeozoic material, lack of a well-resolved phylogenetic framework (making character polarization difficult), and the fact that most studies have focused on hybodonts and neoselachian sharks. Nevertheless, some studies have investigated the enameloid microstructure of synchodontiforms (Guinot & Cappetta, 2011), stem neoselachians (Andreev & Cuny, 2012), and non-neoselachian chondrichthyan (Gillis &

Donoghue, 2007), allowing them to make inferences and propose hypotheses on the evolution of the tooth hypermineralized cover within chondrichthyans. Gillis & Donoghue (2007) demonstrated that the phylogenetic distribution of the enameloid microstructure in their taxa provided strong evidence for the presence of a sole SCE unit as the ancestral condition in the ancestral chondrichthyan tooth, including the holocephalan tooth plates. However, it is controversial whether chimaeroids actually possess an enameloid cover on their dental plates, with some studies describing a pleromin cover instead, which is a hypermineralized tissue composed of large granular crystallites of exclusively mesenchymal origin (Ishiyama, Sasagawa & Akai, 1984; Ørving, 1985). According to Andreev & Cuny (2012) and Cuny *et al.* (2009), stem neoselachians probably also exhibited a SCE cover, devoid of bundles, a condition supposedly shared by batomorphs, which then retained this ancestral neoselachian enameloid through their evolution. In selachimorphs, the superficial part of the SCE was retained, whereas the rest of the enameloid cover gradually became more complex. This led first to the development of bundles, which marked the appearance of the PBE component (for a description of the increase of structural complexity of this component, see Andreev & Cuny, 2012) and subsequently to the formation of the TBE component through alteration of the already-formed PBE. The main innovation of the PBE concerns its preferential orientation parallel to the surface of the crown, whereas the enameloid among most hybodonts and batomorphs show a dominant structural orientation perpendicular to the crown surface.

Our data show that we need to re-evaluate at least part of this previously proposed scenario. First, Guinot *et al.* (2013) demonstrated the presence of a PBE in the ctenacanth *N. flagstaffensis*, whereas *Glikmanius* (Fig. 2A, B) lacks any degree of microstructural differentiation. Two other ctenacanthiforms [*Ctenacanthus compressus* Newberry, 1889 (= *Ctenacanthus concinnus*; Newberry, 1875) and *Ctenacanthus* sp.] were also inferred to possess a SCE devoid of microstructural differentiation (Gillis & Donoghue, 2007), although it is unclear whether the microstructure of both taxa was explored in detail. However, ctenacanthids are most likely paraphyletic, and neither *Glikmanius*, nor *Neosaivodus* have associated fin spines. Still, the presence of a PBE in a ctenacanthiform was completely unexpected and means that the differentiation of this component can no longer be considered unique to selachimorphs. This also implies that the distribution of parallel bundles within chondrichthyan enameloid might be more widespread than previously suspected. This further raises some biomechanical questions because the differentiation of the PBE and TBE components in selachimorphs was interpreted by Gillis & Donoghue

(2007) as a pre-adaptation to the cutting function of the teeth of many neoselachian sharks. However, some Mesozoic hybodonts, as well as the Palaeozoic genus *Carcharopsis* Agassiz, 1843, also exhibit serrated cutting dentitions without developing a complex enameloid microstructure or even bundles, whereas at least some ctenacanthiform exhibit bundles but are not associated with a cutting dentition.

Hybodonts and batomorphs were shown to exhibit a more complex microstructural differentiation than previously assumed. Although the amount of data concerning hybodont enameloid is still scarce, some observations concerning its evolution can be made. As noted above, the typical hybodont enameloid is composed of an outer unit which is very dense and devoid of any microstructural differentiation (the crystallites do not show any particular orientation, SCE) and an inner unit exhibiting short bundles of crystallites preferentially oriented normal to the surface (loosely defined RBE). Such an enameloid organization is also found in large, button-like dermal denticles of hybodont sharks (Fig. 2M), which suggests that this organization is likely plesiomorphic. Data on batomorph enameloid microstructure is even scarcer than for hybodonts, although several points can be discussed. First, based on the oldest specimen investigated here, *Belemnobatis* sp., and on preliminary data from the Archaeobatidae, the oldest batomorph family, it appears that the ancestral batoid enameloid already exhibited some degree of complexity. The Rajiformes appear to exhibit the most variation in enameloid microstructure, from a classical single unit of SCE to a well-differentiated and complex enameloid comprising of two distinct units, although they represent the most generalist diet. Conversely, the Myliobatiformes, an ecologically very diverse clade encompassing hard prey specialists and planktivorous forms, appear to share a very simplified hypermineralized cover, made up of a single unit of SCE. This is of particular interest because their teeth are submitted to either strong biomechanical forces in the case of shell crushers, which typically possess a very thin enameloid layer compensated by a very thick dentine, or to a theoretical absence of mechanical strain in planktivorous diets. As such, their enameloid microstructure appears to reflect only their close phylogenetic relationships rather than any environmental factors linked to their ecologic specialization. It should be noted, however, that the planktivorous selachimorphs *Cetorhinus* Blainville, 1816 and *Rhincodon* Smith, 1829 have retained a complex triple enameloid.

CONCLUSIONS

The observations made over the past decades, along with those of the present study, suggest that the

chondrichthyan enameloid encompasses up to two units. The first one is an external SCE with all crystallites showing little or no preferential orientation, resulting in a rather homogeneous tissue. Trivial preferential orientation rarely occurs, with crystallites arranged perpendicular to the surface. The second unit, when present, is represented by the inner BCE. This comprises clustered crystallites organized into bundles, which are either oriented normal to the surface of the enameloid (RBE), parallel to the crown surface (PBE) or have no preferred orientation (TBE). Current knowledge on the distribution of tooth enameloid characters suggests that there is a link between enameloid microstructure, tooth morphology, and possibly tooth size.

Hybodonts possessing small, flat crushing teeth, such as *Lissodus* usually exhibit the SCE unit and a rather poorly defined BCE (RBE). Taxa with similar tooth morphologies but with larger-sized teeth (*Asteracanthus*, *Acrodus*, and the modern *Heterodontus*) possess both an outer SCE, generally well-developed, and an inner BCE in which bundles tend to intermingle, resulting in a TBE component. This could represent a structure able to dissipate compressive forces, although this hypothesis needs further testing. The presence of well-defined bundles in large hybodont teeth only, hints at a link between tooth size and the presence of bundles in hybodonts. However, batomorphs that possess large crushing or grinding teeth, such as *Leidybatis*, *Hypsobatis* or *Rhombodus* only exhibit a thin SCE. These taxa typically possess a well-developed dentine, similar to that described in other myliobatids (Enault *et al.*, 2013). We hypothesize that the extremely thick dentine may replace the TBE component for coping with compressive forces during feeding. Other batomorphs, such as *Ptychotrygon*, *Parapalaeobates* or *Belemnobatis* exhibit bundles that tend to interweave and are often oriented normal to the crown surface. Hence, the radial component (RBE) is also found in batomorphs, even if it is usually not as well defined as what can be observed in selachimorph taxa. The great diversity of morphology and complexity of batomorph tooth enameloid discerned so far demonstrates that further investigation is needed before the full extent of this diversity can be assessed.

In taxa possessing highly crowned teeth with tearing or cutting functions, the bundled enameloid shows a tendency to be organized into bundles oriented predominantly parallel to the crown surface (the PBE component). This usually appears to be linked to a reduction of the SCE component (formerly known as the 'SLE' of selachimorph sharks). In addition to this reduction of the SCE, selachimorph shark teeth are characterized by the association of the PBE with a TBE. These components grade into each other, the reason for which has not yet been ascertained, although it may be linked to developmental processes. A similar organization was reported in actinopterygians that possess

a cutting dentition, such as piranhas (Reif, 1979), further supporting the idea that enameloid microstructure is linked to tooth morphology. In other sharks (some stem-chondrichthyans and hybodonts), the bundled enameloid is absent and the enameloid is made of a rather homogeneous SCE. Despite the absence of a PBE, some stem-chondrichthyans (*Carcharopsis*) and hybodonts (*Priohybodus*; d'Erasmus, 1960) developed a tearing or cutting dentition through a compaction of the SCE and re-orientation of the crystallites perpendicular to the surface. It has been argued that enameloid microstructure was a preadaptation facilitating the rise of novel and complex feeding strategies in neoselachians (Thies & Reif, 1985; Gillis & Donoghue, 2007), although the scarcity of cutting and tearing dentitions in non-neoselachians could also be a question of timing and niche availability rather than a functional shortcoming.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank J. C. Mouny for providing several SEM images of shark enameloid, H. Cappetta for the batomorph material, and D. Cot (IEM, UM2) for SEM assistance. We also thank the associate editor and the two anonymous reviewers who helped to improve the quality of the manuscript. This is publication ISE-M 2015-018.

REFERENCES

- Agassiz L. 1833–1843.** Recherches sur les Poissons Fossiles. Five volumes, 1420 pp., with supplements. Neuchatel et Soleure (Petitpierre).
- Andreev P. 2010.** Enameloid microstructure of the serrated cutting edges in certain fossil carcharhiniform and lamniform sharks. *Microscopy Research and Technique* **73**: 704–713.
- Andreev P. 2011.** Convergence in dental histology between the Late Triassic semionotiform *Sargodon tomicus* (Neopterygii) and a Late Cretaceous (Turonian) pycnodontid (Neopterygii: Pycnodontiformes) species. *Microscopy Research and Technique* **74**: 464–479.
- Andreev PS, Cuny G. 2012.** New Triassic stem selachimorphs (Chondrichthyes, Elasmobranchii) and their bearing on the evolution of dental enameloid in Neoselachii. *Journal of Vertebrate Paleontology* **32**: 255–266.
- Arambourg C. 1952.** Les vertébrés fossiles des gisements de phosphates (Maroc-Algérie-Tunisie). *Notes et Mémoires du Service Géologique du Maroc* **92**: 1–372.
- Aschliman NC, Nishida M, Miya M, Inoue JG, Rosana KM, Naylor GJP. 2012.** Body plan convergence in the evolution of skates and rays (Chondrichthyes: Batoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **63**: 28–42.
- Bendix-almgreen SE. 1983.** *Carcharodon megalodon* from the Upper Miocene of Denmark, with comments on elasmobranch tooth enameloid: coronoin. *Bulletin of the Geological Society of Denmark* **32**: 1–32.

- Blainville HMD. 1816.** Prodrome d'une nouvelle distribution systématique du règne animal. *Bulletin de la Société Philomathique de Paris* **8**: 105–112, 121–124.
- Botella H, Plasencia P, Marquez-Aliaga A, Cuny G, Dorka M. 2009.** *Pseudodalatias henarejensis* nov. sp. a new pseudodalatiid (Elasmobranchii) from the Middle Triassic of Spain. *Journal of Vertebrate Paleontology* **29**: 1–7.
- Brough J. 1935.** On the structure and relationships of the Hybodont sharks. *Memoirs and Proceedings of the Manchester Literary and Philosophical Society* **79**: 35–49.
- Cappetta H. 1987.** Mesozoic and Cenozoic Elasmobranchii, Chondrichthyes II. In: Schultze HP, ed. *Handbook of paleoichthyology*, Vol. 3B. Stuttgart: Verlag F. Pfeil, 1–193.
- Cappetta H. 1990.** Hexanchiforme nouveau (Neoselachii) du Crétacé inférieur du sud de la France. *Palaeovertebrata* **20**: 33–54.
- Cappetta H. 1992.** Nouveaux Rhinobatoidei (Neoselachii, Rajiformes) à denture spécialisée du Maastrichtien du Maroc. *Remarques sur l'évolution dentaire des Rajiformes et des Myliobatiformes*. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie-Abhandlungen* **187**: 31–52.
- Cappetta H. 2012.** Mesozoic and Cenozoic Elasmobranchii: teeth, chondrichthyes. In: Schultze HP, ed. *Handbook of paleoichthyology*, Vol. 3E. Stuttgart: Verlag F. Pfeil, 1–512.
- Carr A, Kemp A, Tibbetts I, Truss R, Drennan J. 2006.** Microstructure of pharyngeal tooth enameloid in the parrotfish *Scarus rivulatus* (Pisces: Scaridae). *Journal of Microscopy* **221**: 8–16.
- Cione AL, Bonomo M. 2003.** Great white shark teeth used as pendants and possible tools by Early-Middle Eocene terrestrial mammal hunter-gatherers in the Eastern Pampas (Southern South America). *International Journal of Osteoarchaeology* **12**: 222–231.
- Cuny G. 1998.** Primitive neoselachian sharks: a survey. *Oryctos* **1**: 3–21.
- Cuny G. 2008.** Mesozoic hybodont sharks from Asia and their relationships to the genus *Ptychodus*. *Acta Geologica Polonica* **58**: 211–216.
- Cuny G, Benton M. 1999.** Early radiation of the Neoselachian sharks in Western Europe. *Geobios* **32**: 193–204.
- Cuny G, Rieppel O, Sander PM. 2001.** The shark fauna from the Middle Triassic (Anisian) of North-Western Nevada. *Zoological Journal of the Linnean Society* **133**: 285–301.
- Cuny G, Risnes S. 2005.** The enameloid microstructure of the teeth of Synchondontiform sharks (Chondrichthyes, Neoselachii). *PalArch* **3**: 8–19.
- Cuny G, Srisuk P, Khamha S, Suteethorn V, Tong H. 2009.** A new elasmobranch fauna from the middle Jurassic of southern Thailand. *Geological Society, London, Special Publications* **315**: 97–113.
- D'Erasmus G. 1960.** Nuovi avanzi ittiolitici della 'Serie di Lugh' in Somalia conservati nel museo geologico di Firenze. *Palaeontographia Italica* **55**: 1–23.
- Dames W. 1881.** Ueber zähne von *Rhombodus* aus der obersten Tuffkreide von Maastricht. *Sitzungsberichte der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin* **1**: 1–3.
- Dean MN, Wilga CD, Summers AP. 2005.** Eating without hands or tongue: specialization, elaboration and the evolution of prey processing mechanisms in cartilaginous fishes. *Biology Letters* **1**: 357–361.
- Douady CJ, Dosay M, Mahmood SS, Stanhope MJ. 2003.** Molecular phylogenetic evidence refuting the hypothesis of Batoidea (rays and skates) as derived sharks. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **26**: 215–221.
- Drew J, Philipp C, Westneat MW. 2013.** Shark tooth weapons from the 19th century reflect shifting baselines in Central Pacific predator assemblages. *PLoS ONE* **8**: 1–7.
- Duffin CJ. 1980.** A new euselachian shark from the Upper Triassic of Germany. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, Monatshefte* **1980**: 1–16.
- Duffin CJ. 1981.** Comments on the selachian genus *Doratodus* SCHMID, 1861 (Upper Triassic, Germany). *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, Monatshefte* **1981**: 289–302.
- Duffin CJ. 1982.** A palaeospinacid shark from the Upper Triassic of south-west England. *Zoological Journal of the Linnean Society* **74**: 1–7.
- Duffin CJ. 1993.** Late Triassic sharks teeth (Chondrichthyes, Elasmobranchii) from Saint-Nicolas-de-Port (north-east France). *Belgian Geological Survey, Professional Paper, Elasmobranches et Stratigraphie* **264**: 7–32.
- Duffin CJ, Cuny G. 2008.** *Carcharopsis prototypus* and the adaptations of single crystallite enameloid in cutting dentitions. *Acta Geologica Polonica* **58**: 181–184.
- Duffin CJ, Ward DJ. 1993.** The Early Jurassic palaeospinacid sharks of Lyme Regis, southern England. *Belgian Geological Survey, Professional Paper: Elasmobranches et Stratigraphie* **264**: 53–101.
- Enault S, Cappetta H, Adnet S. 2013.** Simplification of the enameloid microstructure of large stingrays (Chondrichthyes: Myliobatiformes): a functional approach. *Zoological Journal of the Linnean Society* **169**: 144–155.
- Enax J, Janus AM, Raabe D, Eppele M, Fabritius H-O. 2014.** Ultrastructural organization and micromechanical properties of shark tooth enameloid. *Acta Biomaterialia* **10**: 3959–3968.
- Enax J, Prymak O, Raabe D, Eppele M. 2012.** Structure, composition and mechanical properties of shark teeth. *Journal of Structural Biology* **118**: 290–299.
- Everett MM, Miller WA. 1981.** Histochemistry of lower vertebrate calcified structures. I. Enamel of the dogfish *Squalus acanthus* compared with mammalian enamel and homologous dentine. *Journal of Morphology* **170**: 95–111.
- Everhart MJ, Caggiano T. 2004.** An associated dentition and calcified vertebral centra of the Late Cretaceous elasmobranch, *Ptychodus anonymus* Williston 1900. *Paludicola* **4**: 125–136.
- Fisher J, Schneider JW, Voigt S, Joachimski MM, Tichomirowa M, Tütken T, Götze J, Berner U. 2013.** Oxygen and strontium isotopes from fossil shark teeth: environmental and ecological implications for Late Palaeozoic European basins. *Chemical Geology* **342**: 44–62.
- Francillon-Vieillot H, de Buffrénil V, Castanet J, Géraudie J, Meunier FJ, Sire JY, Zylberberg L, de Ricqlès A. 1990.** Microstructure and mineralization of vertebrate skeletal

- tissues. In: Carter JG, ed. *Skeletal biomineralization: patterns, processes and evolutionary trends*. New York, NY: Van Nostrand Reinhold, 471–530.
- Gillis JA, Donoghue PCJ. 2007.** The homology and phylogeny of chondrichthyan tooth enameloid. *Journal of Morphology* **268**: 33–49.
- Godefroit P, Cuny G, Delsate D, Roche M. 1998.** Late Triassic vertebrates from Syren (Luxembourg). *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie. Abhandlungen* **210**: 305–343.
- Guinot G, Adnet S, Cavin L, Cappetta H. 2013.** Cretaceous stem chondrichthyans survived the end-Permian mass extinction. *Nature Communications* **4**: 2669.
- Guinot G, Cappetta H. 2011.** Enameloid microstructure of some Cretaceous Hexanchiformes and Synchondontiformes (Chondrichthyes, Neoselachii): new structures and systematic implications. *Microscopy Research and Technique* **74**: 196–205.
- Guinot G, Cappetta H, Adnet S. 2014.** A rare elasmobranch assemblage from the Valanginian (Lower Cretaceous) of southern France. *Cretaceous Research* **48**: 54–84.
- Hamm SA. 2010.** The Late Cretaceous shark *Ptychodus marginalis* in the Western Union seaway, USA. *Journal of Paleontology* **84**: 538–548.
- Herold RC, Graver HT, Christner P. 1980.** Immunohistochemical localization of amelogenins in enameloid of lower vertebrate teeth. *Science* **207**: 1357–1358.
- Hodnett JMP, Elliott DK, Olson TJ, Wittke JH. 2012.** Ctenacanthiform sharks from the Permian Kaibab Formation, northern Arizona. *Historical Biology* **24**: 381–395.
- Holmgren N. 1941.** Studies on the head in fishes. Embryological, morphological and phylogenetical researches. Part II: comparative anatomy of the adult selachian skull, with remarks on the dorsal fins in sharks. *Acta Zoologica Stockholm* **22**: 1–100.
- Hulke JW. 1873.** Memorandum on some fossil vertebrate remains collected by the Swedish expeditions to Spitzbergen in 1864 and 1868. *Bihang Till Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar* **1**: 1–11.
- Ishiyama M, Inage T, Shimokawa H, Yoshie S. 1994.** Immunocytochemical detection of enamel proteins in dental matrix of certain fishes. *Bulletin de l'Institut Oceanographique* **14**: 175–182.
- Ishiyama M, Sasagawa I, Akai J. 1984.** The inorganic content of pleromin in tooth plates of the living holocephalan, *Chimaera phantasma*, consists of a crystalline calcium phosphate known as $\text{BCa}_3(\text{PO}_4)_2$ (Whitlockite). *Archives of Histology and Cytology* **47**: 89–94.
- Jaekel O. 1891.** Ueber die gattung *Pristiophorus*. *Archiv für Naturgeschichte* **57**: 15–48.
- Johns MJ. 1997.** Systematics, in taxonomy and biostratigraphy of Middle and Late Triassic elasmobranch ichthyoliths from northeastern British Columbia. *Geological Survey of Canada Bulletin* **502**: 1–238.
- Kawasaki H, Kawaguchi T, Yano T, Fujimura S, Yago M. 1980.** Chemical nature of proteins in the placoid scale of the blue shark *Prionace glauca* L. *Archives of Oral Biology* **25**: 313–320.
- Kemp NE. 1999.** Integumentary system and teeth. In: Hamlett W, ed. *Sharks, skates and rays – the biology of elasmobranch fishes*. Baltimore, MD: John Hopkins University Press, 43–68.
- Kemp NE, Park JH. 1974.** Ultrastructure of the enamel layer in developing teeth of the shark *Carcharinus menisorrhah*. *Archives of Oral Biology* **19**: 633–644.
- Kerr T. 1955.** Development and structure of the teeth in the dog fish, *Squalus acanthias* L. and *Scyliorhinus caniculus* (L.). *Proceedings of the Zoological Society of London* **125**: 95–114.
- Kerr T. 1960.** Development and structure of some actinopterygian and urodele teeth. *Proceedings of the Zoological Society of London* **133**: 401–422.
- Koot MB, Cuny G, Tintori A, Twitchett RJ. 2013.** A new diverse fauna from the Wordian (Middle Permian) Khuff Formation in the interior Haushi-Huqf area, Sultanate of Oman. *Palaeontology* **56**: 303–343.
- Kvam T. 1946.** Comparative study of the ontogenetic and phylogenetic development of dental enamel. *Norske Tannlaegeforen Tidsskrift Supplement* **56**: 1–198.
- Kvam T. 1950.** *The development of mesodermal enamel on piscine teeth*. Trondheim: Aktiertrykkeriet Trondhjem.
- Kvam T. 1952.** On the development of dentin in fish. *Journal of Dental Research* **32**: 411–419.
- Kvam T. 1953a.** On the development of dentin in fish: I. *Squalus acanthias* Linnaeus. *Journal of Dental Research* **32**: 280–286.
- Kvam T. 1953b.** On the development of dentin in fish: II. Teleostei. *Journal of Dental Research* **32**: 411–419.
- Lebedev OA. 2001.** Vertebrates. In: Mahlina MH, Alekseev AS, Goreva NV, Gorúnova RV, Isakova TN, Kossonova OL, Lazarev SS, Lebedev OA, Skolin AA, eds. *Srednij karbon Moskovskoj sineklizy (úznaâ cast')*. Tom 2. *Paleontologiceskaâ karakteristika*. Moskva: Naučný mir, 196–201.
- LeGeros RZ, Suga S. 1980.** Crystallographic nature of fluoride in enameloids of fish. *Calcified Tissue International* **32**: 169–174.
- Leidy J. 1876.** Remarks on fossils of the Ashley phosphate beds. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* **28**: 86–87.
- Leriche M. 1902.** Les poissons tertiaires de la Belgique. I. Les poissons paléocènes. *Mémoires du Musée Royal d'Histoire Naturelle de Belgique* **2**: 1–48.
- Levi G. 1939a.** Etudes sur le développement des dents chez les téléostéens. I. Les dents de substitution chez les genres *Ophidium*, *Trigla*, *Rhombus*, *Belone*. *Archives d'Anatomie Microscopique* **35**: 101–146.
- Levi G. 1939b.** Etudes sur le développement des dents chez les téléostéens. II. Développement des dents pourvues de dentine trabéculaire (*Esox*, *Sphyræna*). *Archives d'Anatomie Microscopique* **35**: 201–211.
- Levine P, Glimcher M, Seyer J, Huddleson J, Hein J. 1966.** Noncollagenous nature of the proteins of shark enamel. *Science* **1954**: 1192–1194.
- Lison L. 1941.** Recherches sur la structure et l'histogénèse des dents des poissons dipneustes. *Archives de Biologie, Paris* **52**: 279–320.

- Maisey JG, Naylor GJP, Ward DJ. 2004.** Mesozoic elasmobranchs, neoselachian phylogeny and the rise of modern elasmobranchs. Systematics. *Paleoenvironments and Biodiversity* **3**: 17–56.
- Miake Y, Aoba T, Moreno EC, Shimoda S, Probst K, Suga S. 1991.** Ultrastructural studies on crystal growth of enameloid minerals in elasmobranch and teleost fish. *Calcified Tissue International* **48**: 204–217.
- Moss ML. 1961.** The initial phylogenetic appearance of bone: an experimental hypothesis. *Transactions of the New York Academy of Sciences* **23**: 495–500.
- Moss ML. 1964.** The phylogeny of mineralized tissues. *International Review of General and Experimental Zoology* **1**: 297–331.
- Moss ML. 1970.** Enamel and bone in shark teeth: with a note on fibrous enamel in fishes. *Acta Anatomica* **77**: 161–187.
- Moss ML, Jones SJ. 1964.** Calcified ectodermal collagens of shark tooth enamel and teleost scale. *Science* **145**: 940–942.
- Newberry JS. 1875.** Description of fossil fishes. *Report of the Geological Survey of Ohio* **2**: 1–64.
- Newberry JS. 1889.** The Palaeozoic fishes of North America. *United States Geological Survey Monograph XVI*. 340 pp.
- Ørvig T. 1950.** Histologic studies of placoderms and fossil elasmobranchs. I. The endoskeleton, with remarks on the hard tissues of lower vertebrates in general. *Arkiv for Zoologi* **2**: 321–454.
- Ørvig T. 1966.** Histologic studies of ostracoderms, placoderms and fossil elasmobranchs. 2. On the dermal skeleton of two Late Palaeozoic elasmobranchs. *Arkiv for Zoologi* **19**: 1–39.
- Ørvig T. 1967.** Phylogeny of tooth tissues: evolution of some calcified tissues in early vertebrates. In: Miles AEW, ed. *Structural and chemical organization of teeth*. New York, NY: New York Academic Press, 45–110.
- Ørvig T. 1985.** Histologic studies of ostracoderms, placoderms and fossil elasmobranchs. 5. Ptyctodontid tooth plates and their bearing on holocephalan ancestry: the condition of chimaerids. *Zoologica Scripta* **14**: 55–79.
- Owen R. 1840–1845.** *Odontography or a treatise on the comparative anatomy of the teeth; their physiological relations, modes of development and microscopic structure, in the vertebrate animals*. London: Hippolyte Bailliere.
- Peyer B. 1968.** *Comparative odontology*. Chicago, IL: University of Chicago Press, 1–347.
- Poole DFG. 1952.** The fine structure of vertebrate calcified tissues. PhD Thesis, University of Bristol.
- Poole DFG. 1960.** Comparative polarized light studies on various types of enamel. *Journal of Dental Research* **39**: 1107.
- Poole DFG. 1962.** Ontogeny of enamel structures. *The Journal of Bone & Joint Surgery* **44**: 959.
- Poole DFG. 1967.** Phylogeny of tooth tissues: enameloid and enamel in recent vertebrates, with a note on the history of cementum. In: Miles AEW, ed. *Structural and chemical organization of teeth*. New York, NY: New York Academic Press, 111–149.
- Preuschoft H, Reif WE, Müller WH. 1974.** Funktionsanpassungen in Form und Struktur an Haifiszähnen. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgechichte* **143**: 315–344.
- Probst K, Skobe Z. 1988.** Ultrastructure of odontogenic cells during enameloid matrix synthesis in tooth buds from an elasmobranch, *Raja erinacea*. *American Journal of Anatomy* **182**: 59–72.
- Radinsky L. 1961.** Tooth histology as a taxonomic criterion for cartilaginous fishes. *Journal of Morphology* **109**: 73–91.
- Rees J. 2008.** Interrelationships of Mesozoic hybodont sharks as indicated by dental morphology – preliminary results. *Acta Geologica Polonica* **58**: 217–221.
- Rees J, Cuny G. 2007.** On the enigmatic neoselachian *Agaleus dorsetensis* from the European Early Jurassic. *GFF* **129**: 1–6.
- Regan CT. 1906.** A classification of the selachian fishes. *Proceedings of the Zoological Society of London* **1906**: 722–758.
- Reif WE. 1973.** Morphologie und ultrastruktur des Hai-‘Schmelzes’. *Zoologica Scripta* **2**: 231–250.
- Reif WE. 1977.** Tooth enameloid as a taxonomic criterion. I. A new euselachian shark from the Rhaetic-Liassic boundary. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, Monatshefte* **1977**: 565–576.
- Reif WE. 1978.** Tooth enameloid as a taxonomic criterion. II. Is ‘*Dalatias*’ barnstonensis Sykes, 1971 (Triassic, England) a squalomorphic shark? *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, Monatshefte* **1978**: 42–58.
- Reif WE. 1979.** Structural convergences between enameloid and actinopterygian teeth and of shark teeth. *Scanning Electron Microscopy* **2**: 546–554.
- Sansom IJ, Donoghue PCJ, Albanesi G. 2005.** Histology and affinity of the earliest armoured vertebrates. *Biology Letters* **1**: 446–449.
- Sasagawa I. 2002.** Mineralization patterns in elasmobranch fish. *Microscopy Research and Technique* **59**: 396–407.
- Sasagawa I, Akai J. 1992.** The fine structure of the enameloid matrix and initial mineralization during tooth development in the sting rays, *Dasyatis akajei* and *Urolophus aurantiacus*. *Journal of Electron Microscopy* **41**: 242–252.
- Sasagawa I, Ishiyama M, Yokosuka H, Mikami M, Uchida T. 2009.** Tooth enamel and enameloid in actinopterygian fish. *Frontiers of Materials Science in China* **3**: 174–182.
- Satchell PG, Anderton X, Ryu OH, Luan X, Ortega AJ, Opaen R, Berman BJ, Witherspoon DE, Gutmann JL, Yamane A, Zeichner-David M, Spimmer JP, Shuler CF, Diekwisch TGH. 2002.** Conservation and variation in enamel protein distribution during vertebrate tooth development. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **294**: 91–106.
- Schweizer R. 1964.** Die elasmobranchier und holocephalen aus den nusplinger plattenkalken. *Palaeontographica, Abt. A* **123**: 58–110.
- Shimada K. 2012.** Dentition of Late Cretaceous shark, *Ptychodus mortoni* (Elasmobranchii, Ptychodontidae). *Journal of Vertebrate Paleontology* **32**: 1271–1284.
- Shirai S. 1992.** *Squalean phylogeny: a new framework of ‘squaloid’ sharks and related taxa*. Sapporo: Hokkaido University Press, 1–151.

- Smith A. 1829.** Contributions to the natural history of South Africa. *Zoological Journal* **16**: 433–444.
- Stewart JD. 1980.** Reevaluation of the phylogenetic position of the Ptychodontidae. *Transactions of the Kansas Academy of Science* **83**: 154.
- Thies D. 1982.** A neoselachian shark tooth from the lower Triassic of the Kocaeli (= Bithynian) Peninsula, W Turkey. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, Monatshefte* **1992**: 272–278.
- Thies D, Reif WE. 1985.** Phylogeny and evolutionary ecology of Mesozoic Neoselachii. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, Abhandlungen* **169**: 89–106.
- Thomasset JJ. 1928.** Essai de classification des variétés de dentine chez les poissons. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* **187**: 1075–1076.
- Thomasset JJ. 1930.** Recherches sur les tissus dentaires des poissons fossiles. *Archives d'Anatomie, d'Histologie et d'Embryologie* **11**: 6–153.
- Tomes CS. 1898.** Upon the structure and development of the enamel in elasmobranch fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **190**: 443–464.
- Underwood CJ. 2006.** Diversification of the Neoselachii (Chondrichthyes) during the Jurassic and Cretaceous. *Paleobiology* **32**: 215–235.
- Ward DJ, Thies D. 1987.** Hexanchid shark teeth (Neoselachii, Vertebrata) from the Lower Cretaceous of Germany and England. *Mesozoic Research* **1**: 89–106.
- Welton BJ, Zinsmeister WJ. 1980.** Eocene neoselachians from the La Meseta Formation, Seymour Island, Antarctic Peninsula. *Contribution in Science, Natural History Museum of Los Angeles County* **329**: 1–10.
- Winchell CJ, Martin AP, Mallatt J. 2004.** Phylogeny of Elasmobranchs based on LSU and SSU ribosomal RNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**: 214–224.
- Yabe H, Obata T. 1930.** On some fossil fishes from the Cretaceous of Japan. *Japanese Journal of Geology and Geography* **3**: 1–7.

**14.2. Publication 2 : « Simplification of the enameloid
microstructure of large stingrays (Chondrichthyes :
Myliobatiformes) : a functional approach »**

Simplification of the enameloid microstructure
of large stingrays : A functional approach

Sebastien Enault, Henri Cappetta, Sylvain Adnet

Zoological Journal of the Linnean Society

Volume 169, pages 144-155, 2013

Des résultats issus de cette publication ont été présentés au congrès *Mesozoic Fishes* à Vienne, Autriche, en Aout 2013.



Simplification of the enameloid microstructure of large stingrays (Chondrichthyes: Myliobatiformes): a functional approach

SEBASTIEN ENAULT*, HENRI CAPPETTA and SYLVAIN ADNET

ISEM, UMR CNRS 5554, Université Montpellier 2, CC064, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

Received 8 February 2013; revised 17 May 2013; accepted for publication 21 May 2013

The microstructure of neoselachian teeth is characterized by a triple-layered enameloid, despite its purported absence in batoids since their appearance during the early Jurassic. This feature is thought to have been secondarily lost, as an adaptation to durophagy in batoids. The monophyletic Myliobatiformes are an ecologically diverse clade of batoids that includes very specialized taxa such as the filter-feeding mobulids and the durophagous myliobatids. Their diversity and recent evolutionary history (Palaeogene) make them an ideal model for assessing adaptive constraints that influence enameloid microstructure. This first study focusing only on batoid enameloid shows a very reduced single-layered enameloid in the derived filter feeders. However, most other taxa show a double-layered enameloid, which is probably plesiomorphic for batoids. It is concluded that the triple-layered enameloid is not a synapomorphy of the neoselachii as a whole, but of Selachimorpha only, and that diet specialization in derived myliobatoids indeeds impact their enameloid microstructure, which is confirmed by their fossil diversity.

© 2013 The Linnean Society of London, *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2013, **169**, 144–155.
doi: 10.1111/zoj.12059

ADDITIONAL KEYWORDS: Batoids – diet specialization – durophagy – mobulids – myliobatids – planktivory – scanning electron microscopy.

INTRODUCTION

The fossil record of chondrichthyans (holocephalans and elasmobranchs) consists mainly of isolated teeth due to their cartilaginous skeleton. However, other anatomical structures such as dermal denticles, vertebrae and spines may also be preserved and even complete skeletons on exceptional occasions (Cappetta, 1987, 2012). As a consequence, teeth are often the only material available both to describe species and to infer the evolutionary history of this diverse and successful group.

The monophyly of the neoselachians, dating back to the Permian (Ginter, Hampe & Duffin, 2010), is well

supported by both morphological and molecular data (e.g. Carvalho, 1996; Maisey, Naylor & Ward, 2004). Their skeletons display numerous synapomorphies (Carvalho, 1996), which can rarely be relied upon when dealing with fossil material. Only a single dental synapomorphy is identified: a triple-layered enameloid, first described by Reif (1973).

This triple-layered enameloid is composed of an external shiny layered enameloid (SLE), with randomly orientated individualized crystallites, an inner bending-resistant parallel bundled enameloid (PBE), and an internal compression-resistant tangled bundled enameloid (TBE). This complex microstructure is an efficient diagnostic tool when differentiating neoselachians from their supposed sister group, hybodonts, and other Palaeozoic taxa, which most commonly possess only a single-layered enameloid, the single crystallite enameloid (SCE), lacking

*Corresponding author.

E-mail: sebastien.enaault@univ-montp2.fr

microstructural differentiation. Acquisition of the triple layer might be sequential in the evolutionary history of the group (Gillis & Donoghue, 2007), and the SCE was interpreted first as a homologous structure with the PBE/TBE before Andreev & Cuny (2012) recognized the SLE as a residual structure from the ancestral SCE.

Among neoselachians, the batoids are known since the early Jurassic (Delsate & Candoni, 2001; Underwood, 2004, 2006; Kriwet, Kiessling & Klug, 2009; Cappetta, 2012). Batomorphii is the most diverse superorder with about 630 described extant species (McEachran & Dunn, 1998) and have developed a wide range of lifestyles, feeding strategies, and body shapes (Compagno, 1973, 1977).

It is now well established that batoids are the sister group to all modern sharks, based both on early morphological studies (e.g. Regan, 1906; Holmgren, 1941) and on molecular data (e.g. Douady *et al.*, 2003; Winchell, Martin & Mallatt, 2004). However, the microstructure of batoid teeth was little studied, and it appears that they do not possess this triple-layered enameloid (Preuschoft, Reif & Müller, 1974; Reif, 1977; Thies, 1982; Maisey, 1985; Cappetta, 2012), because only a single layer of enameloid has been reported since their appearance during the Jurassic (Cuny *et al.*, 2009). It is unclear whether this is a derived character of batoids (Underwood, 2006) or rather a retained plesiomorphic state of enameloid microstructure (Cuny *et al.*, 2009). This single-layered enameloid was interpreted as a mechanical adaptation toward a durophagous diet (Preuschoft *et al.*, 1974; Botella *et al.*, 2009b). The reconstructed diet of the hypothetical batoid ancestor is also consistent with a durophagous taxon, but extant taxa exhibit a wide range of trophic ecologies, with species able to process elusive and complex prey items (Dean, Bizzarro & Summers, 2007) in addition to durophagous taxa.

To look at the impact of ecological specialization on enameloid microstructure in batoids, the sister clades Myliobatidae and Mobulidae were selected as models. These rays belong to the Myliobatiformes, a monophyletic group including taxa that exhibit highly diverse ecological specializations. Mobulids are large filter feeders whereas myliobatids are durophagous. Their feeding apparatuses may be prone to strong mechanical constraints depending on their feeding habits (e.g. Adnet *et al.*, 2012). Hence, their enameloid should be impacted by both environmental and ancestral factors, considering that both clades share a very close phylogenetic relationship. These features, added to the recent highlighting of their adaptive radiation during the Palaeogene (Adnet *et al.*, 2012), make them an ideal model to assess adaptive constraints to which the enameloid of batoid teeth are subjected.

MATERIAL AND METHODS

MATERIAL

Most of the specimens used in this study belong to the order Myliobatiformes. To polarize characters and to estimate the diversity of batoid enameloid microstructures of the studied groups (myliobatids and mobulids), other taxa in the batoid tree were also considered.

Fossil material consists of isolated teeth from various ages and localities. Teeth of extant specimens were either isolated material or extracted directly from prepared jaws. In this case, teeth were selected at the back of the tooth file to avoid natural dental wear due to feeding, which can quickly remove a part of the enameloid layers. An exhaustive list of the specimens, both fossil and extant, is available in the Appendix. All material used is from the collections of the Palaeontology laboratory, University of Montpellier.

METHODS

All fresh and fossil teeth were embedded in transparent epoxy resin. The resin blocks were then ground to the desired plane of section (labio-lingual longitudinal sections in this case). This was done with a Struers labopol-5 lapidary using 180, 400, 800, 1400, 2400 and 400 grit silicon carbide abrasive papers. Sections were then polished with a polishing pad and aluminium oxide powder.

The preparation and scanning electron microscopy (SEM) protocols used here are largely based on existing literature, which focus mainly on shark teeth (e.g. Cuny & Risnes, 2005; Gillis & Donoghue, 2007; Botella, Donoghue & Martinez-Perez, 2009a). However, a peculiar treatment was deemed necessary on fresh material in which organic matrix appeared to be still present, which made obtaining high-quality pictures difficult. Several protocols were tested to remove it. Treatments included 1-h soaks in bleach, hydrogen peroxide, and potassium hydroxide and heating with an open flame. The results of these tests, which were applied on only a few specimens, did not yield satisfactory results and are not pictured here. Most of the time it led to dentine damage, but the effects on the enameloid itself were unclear if there were any. Furthermore, several teeth were embedded twice in epoxy resin to fill the developed pulp cavity, and then ground once more to the correct plane of section. Teeth with a large pulp cavity tend to shrink more while drying, producing cracks at the boundary between the resin and the enameloid surface, making subsequent interpretation of the images difficult.

Teeth were then etched in diluted 10% HCl for times varying from 5 to 10 s and coated with a gold-palladium alloy prior to SEM analysis. This was

performed with an Hitachi S-4000 at the Cric (IURC) in Montpellier using an acceleration voltage of 20 kV.

RESULTS

The SEM study of the batoid teeth considered here show very different structures from the classical three-layered enameloid found in sharks (see Fig. 1). Except for *Cretomanta*, none of the classical three layers could be positively identified from the pictures, but sampled batoid teeth show a variation from one to two layers of enameloid.

Only two non-myliobatiform genera were analysed here: *Raja* and *Rhynchobatus* (Figs 2A, B, 3I). They both display a medium to thick enameloid, about 70 μm thick for *Raja* and over 200 μm for *Rhynchobatus*. The enameloid appears to be made of at least two layers: an inner layer formed of parallel bundles of fibres, which are orientated perpendicular to the surface of the crown, and an outer layer which is more compact and irregular, with fibres seemingly forming tight bundles showing no particular orientation.

A similar organization is also found in most sampled myliobatiforms, with the exception of a few taxa including mobulids and gymnurids, which will be discussed later. The enameloid microstructure of *Himantura* and *Pteroplatytrygon* (Fig. 2C, D) is very similar to what can be observed in the non-myliobatiforms, although the inner layer is thicker in *Himantura*. In fossil specimens, this inner layer appears to be much more compact, and as a result the bundles of fibres can be difficult to see (Fig. 2E, F, G).

Fossil myliobatids such as *Igdabatis*, *Brachyrhizodus*, and extinct species of *Myliobatis* (Fig. 2F, G, H) show an enameloid microstructure very similar to that of extant species, also composed of two distinct

layers, displaying the same organization as before, but thicker. The enameloid of another extinct myliobatid, *Eomobula*, could not be observed properly, probably due to the remineralization of the fossil. It is therefore not possible to assess if the enameloid possesses a single or two layers, as expected from the observations of other myliobatids.

Only two groups do not display this two-layered enameloid: the gymnurids and the mobulids. Three extant species of gymnurids were sampled: *Gymnura altavela*, *Gymnura marmorata*, and *Gymnura micrura*, with only the first-named being figured here (Figs 2L, 3J). An additional fossil representative of the same genus from the Miocene is also figured (Fig. 2M). Observation of the Gymnuridae in general proved difficult due to the extremely small size of their teeth. All specimens analysed here display a single-layered enameloid which appears very compact, and without clear microstructure. This is probably the result of the strong compaction of poorly individualized crystallites. This single-layered enameloid is easily distinguishable from the underlying dentine, but the transition between both is diffuse. There are no distinguishable differences between the enameloid microstructure of fossil and extant specimens. *Jacquhermania* (Fig. 2N), an extinct taxon from the Eocene and attributed to the Gymnuridae (Cappetta, 2012), seems to possess a single layer of enameloid which was apparently very damaged during the etching process, or might have been naturally eroded before etching.

Mobulids as a whole exhibit a very similar organization, although their single enameloid layer appears thinner than in gymnurids, with thickness ranging from 5 to 20 μm in sampled specimens. Palaeogene Mobulidae taxa *sensu lato* (see Adnet *et al.*, 2012), such as *Plinthicus* (Fig. 2O) and *Oromobula* (Fig. 3A,

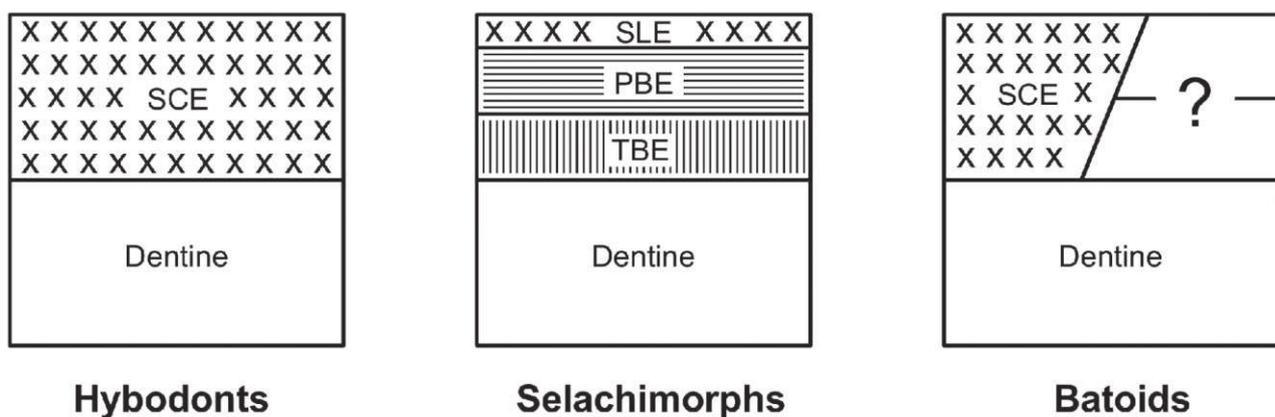


Figure 1. Schematic organization of the enameloid layers in hybodonts (sister group of neoselachians), selachimorphs, and batoids.

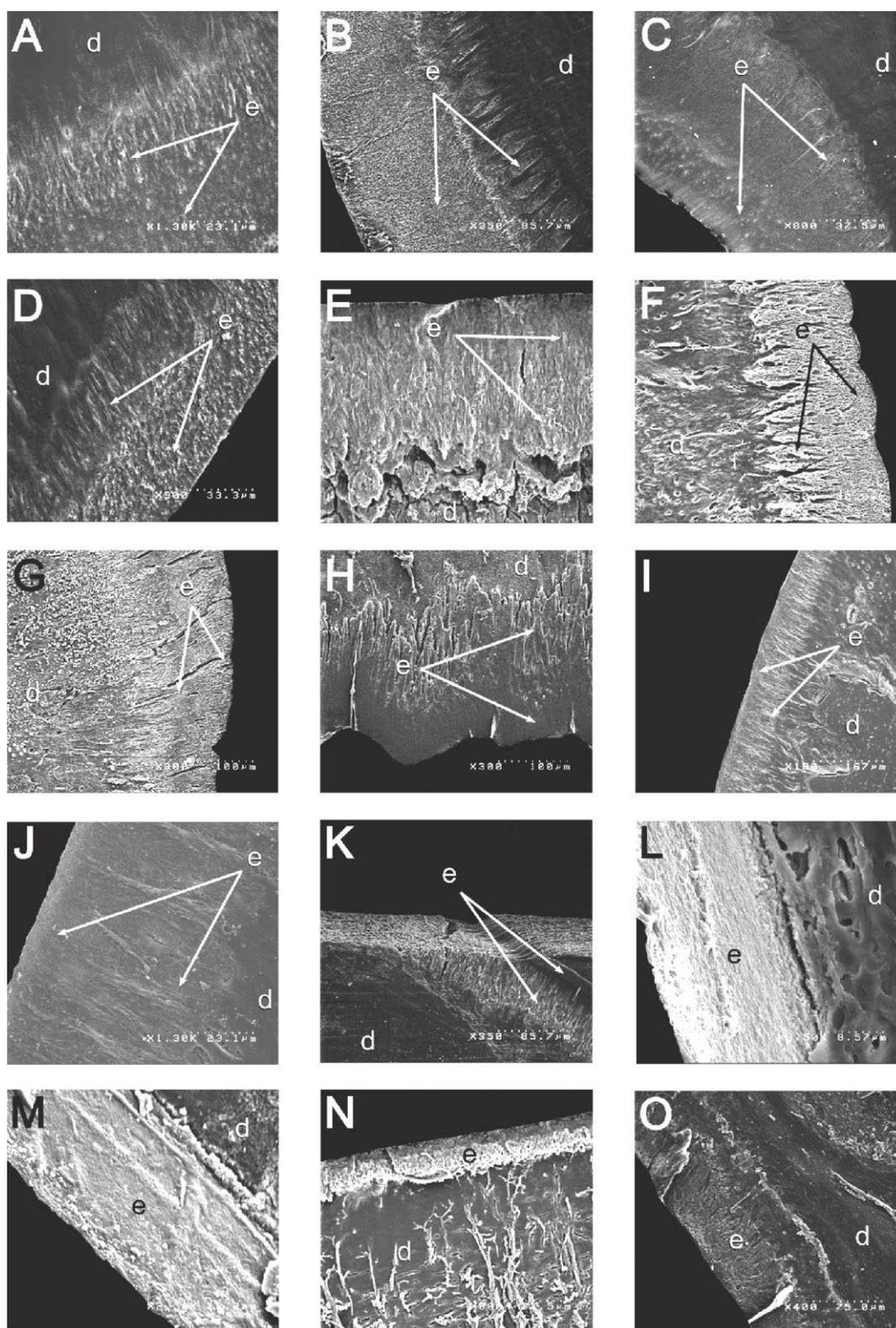


Figure 2. SEM images of non-mobulid batoids: A, *Raja clavata*; B, *Rhynchobatus* sp.; C, *Himantura uarnak*; D, *Pieroplattytrygon violacea*; E, †Dasyatidae; F, †*Igdabatis* sp.; G, †*Brachyrhizodus wichitaensis*; H, †*Myliobatis raouxi*; I, *Aetobatus narinari*; J, *Myliobatis aquila*; K, *Rhinoptera* sp.; L, *Gymnura altavela*; M, †*Gymnura* sp.; N, †*Jacquhermania duponti*; O, †*Plinthicus* sp.; d, dentine; e, enameloid.

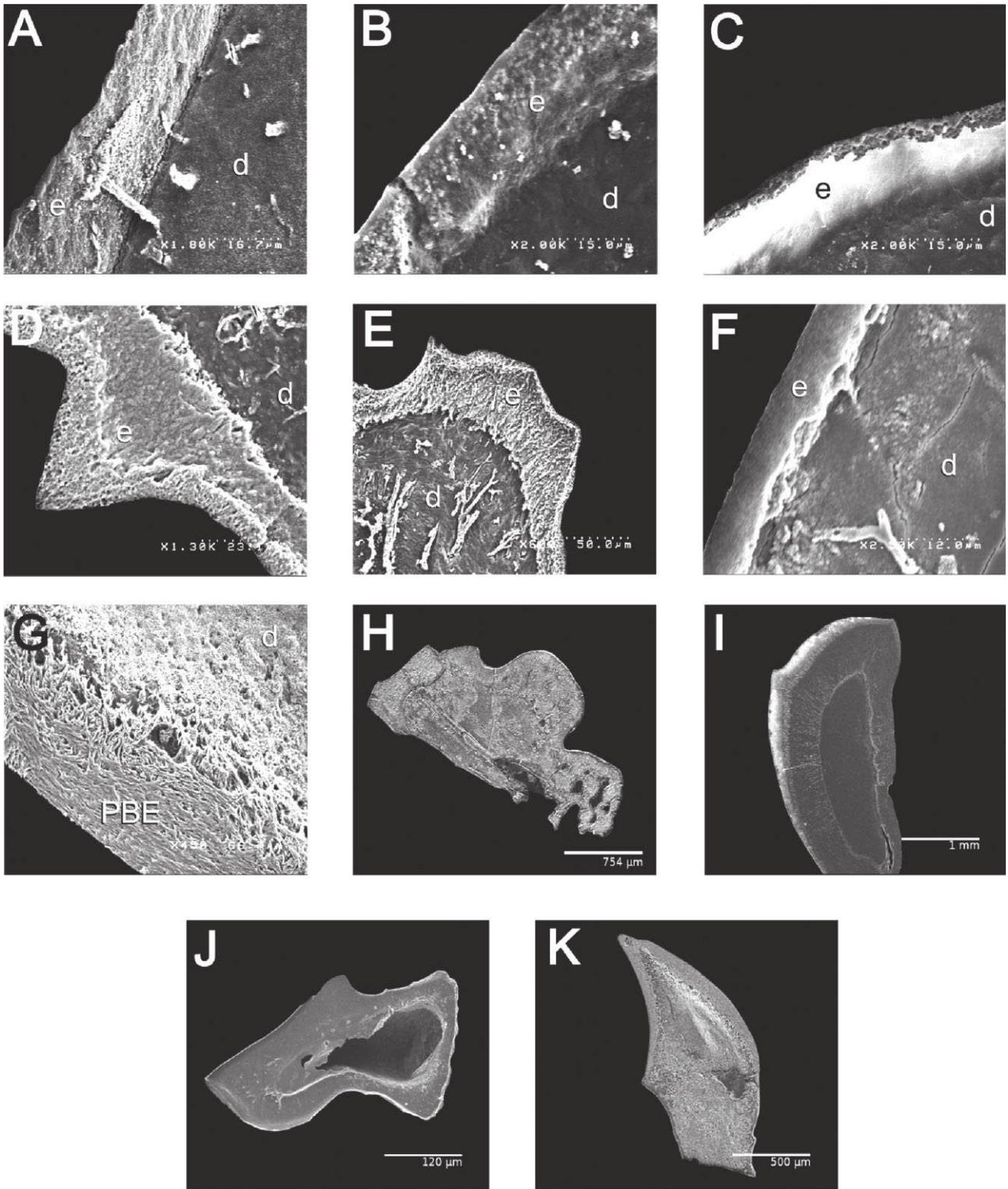


Figure 3. SEM images of mobulid batoids: A, †*Oromobula* sp.; B, *Mobula japonica*; C, *Manta birostris*; D, †*Burnhamia* sp.; E, †*Burnhamia* sp.; F, †*Archaeomanta* sp.; G, †*Cretomanta canadensis*; H, †*Oromobula* sp.; I, *Rhynchobatus* sp.; J, *Gymnura* sp.; K, †*Cretomanta canadensis*.

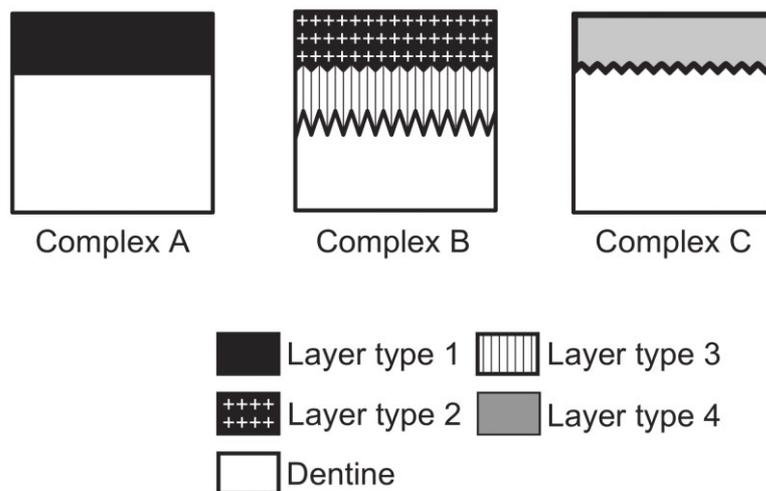


Figure 4. Schematic organization of the enameloid layers found in sampled batoid taxa. Proportions are not respected.

H), possess a single layer of enameloid, thin and compact and without clear microstructure, which is very similar to what can be seen in extant mobulids (Fig. 3B, C). Their tooth morphology rules out affiliation to the Gymnuridae. *Plinthicus*, despite possessing a rhinopterid-like dentition (Purdy *et al.*, 2001; Cicimurri & Knight, 2009) was already placed within mobulids in earlier works (Cappetta, 1970, 1987; Cappetta & Stringer, 2002), an attribution which is supported by its enameloid microstructure as observed here. *Oromobula*, a newly described genus (Adnet *et al.*, 2012), displays a similar enameloid structure.

Interpretation of the pictures of the genus *Burnhamia* (Fig. 3D, E) has proved difficult. Both sampled specimens are from the same locality (see Appendix), and according to the pictures, seem to possess both a single- and a two-layered enameloid depending on the region of the tooth. This genus is considered a basal mobulid, and it was suggested that it might not be strictly planktivorous (Adnet *et al.*, 2012), which could explain its unusual enameloid.

The extinct genera *Archaeomanta* (Fig. 3F) and *Cretomanta* (Fig. 3G, K) possess teeth resembling mobulid teeth, but numerous authors have expressed doubts as to their position within mobulids because their tooth morphology is considered convergent (see Adnet *et al.*, 2012). The presence of a PBE in the enameloid microstructure of *Cretomanta* (see Discussion) reveals that it must belong to the selachimorphs.

No SLE or equivalent surface layer could be observed in any of the sampled specimens. It could either be absent in batoids or be an artefact due to the etching process, as this layer is very thin, and quickly destroyed in etched shark specimens as well.

DISCUSSION

Three different complexes (A–C) were identified following the description of the enameloid microstructure of sampled specimens. A standardized schematic based on SEM pictures is illustrated in Figure 4. This approach was taken because homologies between the layers observed in batoids and the triple layers of sharks remain unclear and necessitate further investigation. In other words, as it was difficult to assess with certainty if there was an SLE, PBE, or TBE or even if the layers were a sort of SCE, the choice was made to use those structural complexes.

COMPLEX A

The first complex (A) is composed of a single and thin layer of enameloid which appears very compact, and without clear microstructure, which is probably the result of the strong compaction of poorly individualized crystallites. It is labelled as 'Layer type 1' (Fig. 4). Its thickness varies little, and although it is easily distinguishable from the underlying dentine, the transition between the two is diffuse. This complex is characteristic of gymnurids and all sampled mobulids, with the exception of *Burnhamia* (Fig. 3D, E). Gymnurids also display a thin and single-layered enameloid (Fig. 2L, M, N), which appears highly compact and without a clearly defined microstructure, both in fossil and in extant specimens. This organization is very similar to what can be observed in both extant and fossil mobulids (Figs 2O, 3A, B, C); however, the enameloid appears to be thicker in gymnurids, which are not planktivorous but feed mainly on teleost fishes and various invertebrates (Allen & Robertson, 1994). The similarity of gymnurid enameloid microstructure with

mobulids remains to be explained and might be a case of convergence.

COMPLEX B

The second complex is composed of two distinct layers of enameloid. The outer layer is similar to complex A, although it appears less compact and more irregular. Therefore, it is labelled as 'Layer type 2' (Fig. 4). The inner layer shows a very progressive transition with the underlying dentine. This inner layer is formed by parallel bundles of fibres that are perpendicular to the crown, and is labelled as 'Layer type 3' (Fig. 4). It is present in the non-myliobatiform batoids analysed here, *Raja* and *Rhynchobatus* (Figs 2A, B; 3I). This complex is also widely represented in sampled members of Myliobatiformes (Fig. 2C–K), with the exception of the mobulids and the gymnurids, both extants and fossils, discussed above and assigned to complex A.

COMPLEX C

The third complex (C) is less clear, and appears to be composed of a single enameloid layer which is less compact than in A and shows crystallites that are either isolated or organized in short fibres, orientated almost perpendicularly to the occlusal surface. This layer is called 'Layer type 4' in the corresponding figure. The transition with the dentine is unclear and irregular. This organization is currently seen in a single taxon, namely *Burnhamia* (Fig. 3D, E), a basal mobulid (see Adnet *et al.*, 2012), although some SEM pictures seem to indicate what could be interpreted as a two-layered enameloid on some areas of the teeth, especially on the ornamentations (see Fig. 3D). This is why a third complex was created, before further investigation can clarify the enameloid microstructure of this taxon.

These complexes were then mapped on a phylogeny (see Fig. 5) based on recent molecular studies (Aschliman *et al.*, 2012, modified). Fossil taxa were added based on existing literature (Cappetta, 1987, 2012; Claeson *et al.*, 2010; Adnet *et al.*, 2012). Crown Selachimorpha (modern sharks) and their stem group Synechodontiformes were treated as the outgroup to a monophyletic Batomorphii. The data concerning their enameloid microstructure were based on the relevant literature (e.g. Reif, 1973; Cuny & Risnes, 2005; Guinot & Cappetta, 2011).

Despite a non-exhaustive sampling, it seems that the double-layered complex B represents the plesiomorphic state in batoids, given that it is found in both non-myliobatiforms and almost all myliobatiforms with the exception of Gymnuridae and Mobulidae.

As described in the Results, the structure of the inner layer, found in complex B, shows bundles of

fibres perpendicular to the surface of the crown. This orientation suggests resistance to compressive forces, and appears similar to the inner layer of some 'double-layered' durophagous hybodonts described by Cuny, Rieppel & Sander (2001). These bundles of fibres are orientated apico-basally, which is the same spatial orientation as the PBE of sharks. However, they are parallel to the surface of the crown in sharks due to their cuspidate teeth, whereas they remain perpendicular to the flattened crown surface in the batoid teeth analysed here. Taxa with high cuspidate teeth remain to be investigated to see how these bundles of fibres are orientated, if present. However, even the relatively cuspidate teeth analysed here (*Gymnura*, Figs 2L, M, 3J) do not display bundles parallel to the surface of the teeth. So while they have the same spatial orientation (apico-basally) they cannot be considered the same unit. Their morphology is also very different from the shark PBE, which comprises tight bundles of micro-crystals, whereas the inner layer of batoids shows long bundles of fibres, the transition with both the underlying dentine and the outer layer is diffuse, and the crystallites seem poorly individualized. Reif (1977) noted that batoid enameloid was very reduced and poorly calcified, making it difficult to observe, and also noted the absence of PBE in this group.

ENAMELOID MICROSTRUCTURE OF MYLIOBATOIDS AND MECHANICAL CONSTRAINTS

Myliobatoids (here comprising Gymnuridae, Rhinopteridae, Myliobatidae, and Mobulidae) as a whole present notable differences in their enameloid microstructure (see Figs 2, 3). However, despite these structural differences, the enameloid appears to be very thin in all myliobatoids, except for the basal Myliobatidae *Myliobatis raouxi* and *Igdabatis* sp. where it appears thicker. This very thin enameloid is an interesting feature when considering their extreme feeding habits. Mobulids are planktivorous, and hence their teeth are not subject to any mechanical or functional constraints and their enameloid is expected to reflect only a phylogenetic signal. This lack of mechanical constraints could explain the apparent simplicity of their layer in complex A. By contrast, myliobatids are durophagous, and are capable of crushing hard prey despite their cartilaginous jaws (Summers, 2000) meaning their enameloid is subject to high mechanical stresses, probably more than in any other batoid taxa. The thinness of their enameloid compared with non-Myliobatiformes is thus probably compensated for by their very thick dentine layer, without a pulpal cavity, and teeth that are often fused and interlocking to form crushing plates (Cappetta, 1987, 2012). There is also a

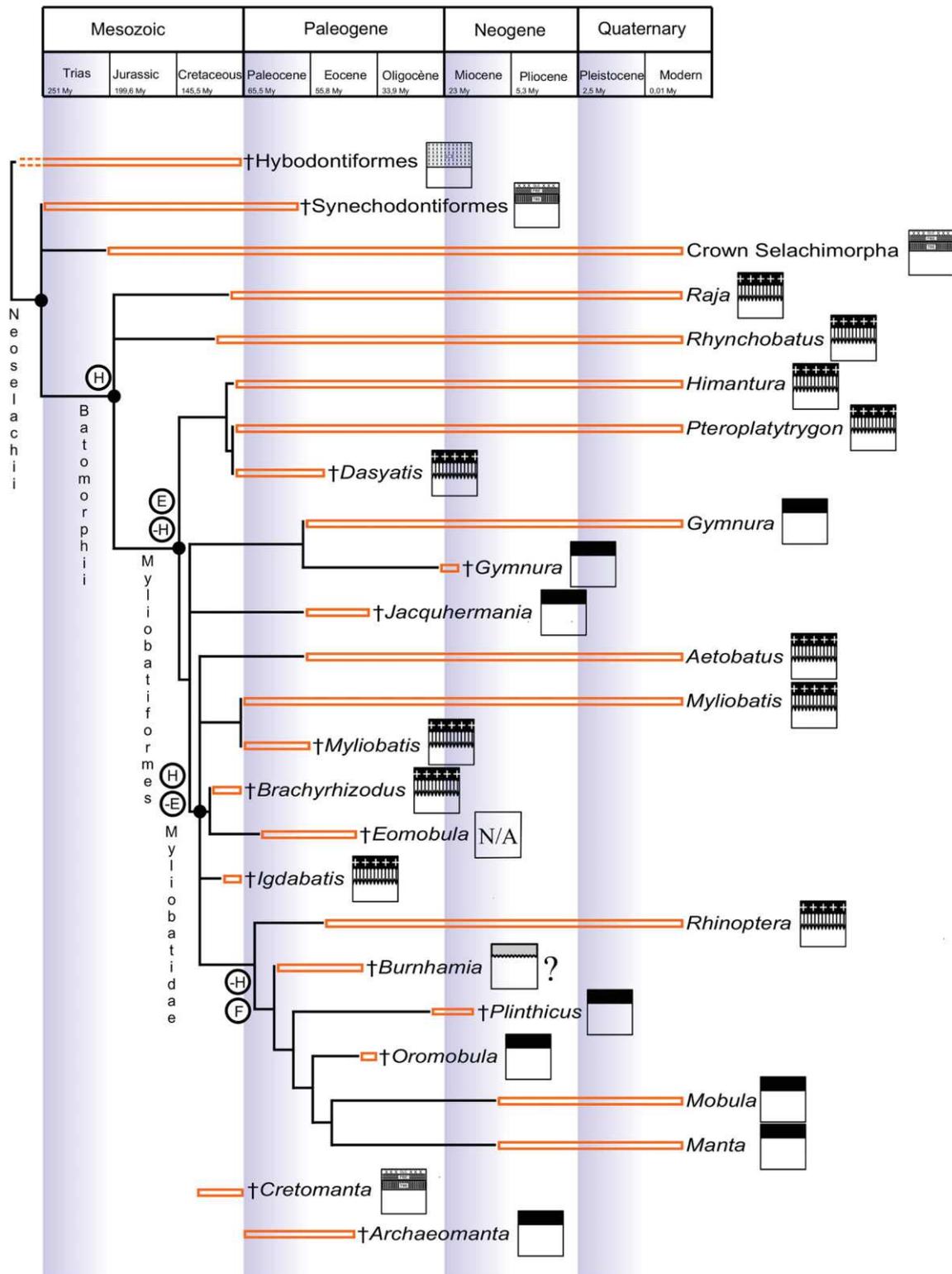


Figure 5. Phylogeny of the sampled neoselachian taxa along with their enameloid structure. This phylogeny is based on the work of Claeson *et al.* (2010), Adnet *et al.* (2012) and Aschliman *et al.* (2012). The position of the genera *Cretomanta* and *Archaeomanta* is not resolved, and thus they are not branched on the phylogeny. Red carriages indicate known fossil record. Circles indicate diet: H, hard prey; E, elusive prey; F, filtered prey. Based on and simplified from Dean *et al.* (2007).

reduction in the number of dental files, such as in *Aetobatus*, a genus which possess only a single central dental file (Cappetta, 1987, 2012). The jaw is also composed of trabecular cartilage, which is similar to trabecular bone. Some studies have shown that their jaws had both surface calcification, but also mineralized struts running through the centre of the cartilaginous structure (Summers, Koob & Brainerd, 1998; Summers, 2000). Furthermore, these jaws are also associated with powerful ligaments and muscles, making them a complex and a very powerful tool for grinding hard prey items.

ENAMELOID REDUCTION IN MOBULIDAE

Mobulids are the most derived group among the batoids studied here, and are all characterized by the same structural complex (A) with the exception of *Burnhamia*, as discussed before and which is probably not an exclusively planktivorous taxon (see Fig. 5). Mobulids are nested among durophagous taxa, which suggest that durophagy was lost secondarily in these planktivorous taxa (Nishida, 1990; Lovejoy, 1996; McEachran, Dunn & Miyake, 1996; Summers, 2000). Based on our SEM results, it appears that the single layer of enameloid found in mobulids is potentially homologous with the outer layer of complex B, which would imply the loss of the inner layer in mobulids. The fact that mobulid teeth are not prone to mechanical constraints due to their planktivorous diet could explain the loss of this layer and suggests that mechanical constraints linked to feeding habits indeed have an impact on the enameloid microstructure of these animals. Because the mobulid adaptive radiation took place during the Palaeogene (Adnet *et al.*, 2012), we hypothesize that this transition would have taken place quickly and early in the evolutionary history of this group. The retention of the single-layered enameloid may in part be explained by both a biomechanical and a phylogenetic perspective. Mobulid teeth must serve only during the reproductive period, these animals having a complex pre-copulatory behaviour in which the male bites the female repeatedly (Marshall, 2009). *Manta*, one of the most derived taxa, even lacks upper teeth, which can be replaced by two rows of dermal denticles (Marshall, Compagno & Benett, 2009). Hence, the retention of this single-layered enameloid remains to be explained from both a biomechanical and a phylogenetic perspective.

Complex C, containing only the genus *Burnhamia*, might possibly represent some kind of intermediary state between myliobatids and mobulids, or this taxon could in fact belong to either complex A or B. Further study of the enameloid of this genus is needed to clarify its peculiar enameloid structure.

THE CASE OF *ARCHAEOMANTA* AND *CRETOMANTA*

Archaeomanta and *Cretomanta* are enigmatic taxa tentatively grouped within mobulids in the past. The enameloid of extinct *Archaeomanta* is very thin and closely resembles that of extant Gymnuridae or Mobulidae, but the presence of a large pulp cavity extending to the tip of the cusp (Underwood *et al.*, 2011) argues against its attribution to mobulids. The enameloid of *Cretomanta* (Fig. 3G, K) shows clear differences from other studied taxa. Both a PBE and a TBE can be seen, which is the typical organization of the enameloid of neoselachian sharks. The SLE could not be observed, but it is probably an etching artefact, which is a known problem due to the thinness and sensitivity of the SLE in selachimorph neoselachians (Reif, 1979; Gillis & Donoghue, 2007). *Cretomanta* was first described as a filter feeder closely related to the genus *Manta* (Case, Tokaryk & Baird, 1990), based on tooth morphology. However, some authors considered the genus as a planktivorous lamniform (Noubhani & Cappetta, 1997; Cappetta, 2006), or as an undetermined batoid (Underwood & Cumbaa, 2010; Adnet *et al.*, 2012). The presence of a PBE in the enameloid microstructure clearly indicates that *Cretomanta* is most probably a planktivorous shark (i.e. a non-batoid elasmobranch) frequenting the Late Cretaceous seas with the other giant filter feeders (Cavin, 2010).

CONCLUSIONS

The results obtained and discussed in this study highlight several key points. First, batoids as a whole seem to possess only a single- or a double-layered enameloid rather than the triple-layered enameloid previously hypothesized to be a synapomorphy of Neoselachii. We hypothesize that the plesiomorphic condition for batoids was a double layer of enameloid. In some batoids, most notably mobulids, a reduction and simplification of the enameloid structure leads to the loss of one of those layers. We further hypothesize that this is probably related to the absence of mechanical constraints on the teeth, due to their planktivorous diet. Myliobatid teeth also show a very thin enameloid while retaining the plesiomorphic batoid structure of two distinct layers. Their teeth are prone to strong mechanical constraints, which are distributed to the feeding apparatus as a whole to compensate for their very thin enameloid layer.

A major remaining issue is to identify the relationships of homology between the layers discussed here (in complexes A, B, and C), and also between batoids and sharks. So far these relationships remain unclear, and need further investigation. Some authors mention the presence of a SCE or TBE in batoid

enameloïd (Reif, 1977; Gillis & Donoghue, 2007), or the absence of a TBE in primitive batomorphs (Cuny *et al.*, 2009), but further work is required to conclude on the exact nature of these layers. However, it is clear that the PBE is absent in all sampled taxa with the exception of *Cretomanta*, which is not surprising in a functional context, as this layer increases resistance to bending stress (Preuschoft *et al.*, 1974). Batoids have diverse and specialized habits, and dietary modes, although their typically low crowned teeth are not prone to the same mechanical stress as shark teeth (i.e. cutting and gouging). Regardless of the homology of these layers, the triple-layered enameloïd is here considered an autapomorphy of the Selachimorpha only, rather than of neoselachians as a whole, a conclusion also reached by Cuny *et al.* (2009). Thus, future work is also necessary to establish whether the PBE was secondarily lost, such as in the lateral teeth of the durophagous shark taxa *Heterodontus* (Thies, 1982), or if it ever existed at all in batoids. This implies that it is necessary to sample ancient batoid taxa to study their tooth histology, but also to take a closer look at the enameloïd microstructure of taxa exhibiting specialized feeding habits, such as the filter feeder sharks *Rhincodon typus* or *Cetorhinus maximus*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank C. Cazeveille (CRIC-IURC Montpellier) for SEM assistance, and G. Notarbartolo di Sciara for the mobulid specimens and the pluridisciplinary program CS UM2 (Dir. F. Lihoreau) which supported this research. We also thank the three anonymous reviewers for their helpful comments and discussion, which helped improve the quality of this manuscript.

REFERENCES

- Adnet S, Cappetta H, Guinot G, Notarbartolo di Sciara G. 2012.** Evolutionary history of the devilrays (Chondrichthyes: Myliobatiformes) from fossil and morphological inference. *Zoological Journal of the Linnean Society* **166**: 132–159.
- Allen D, Robertson D. 1994.** *Fishes of the tropical Eastern Pacific*. Honolulu: University of Hawaii Press.
- Andreev PS, Cuny G. 2012.** New Triassic stem selachimorphs (Chondrichthyes, Elasmobranchii) and their bearing on the evolution of dental enameloïd in Neoselachii. *Journal of Vertebrate Paleontology* **32**: 255–266.
- Aschliman NC, Nishida M, Miya M, Inoue JG, Rosana KM, Naylor GJP. 2012.** Body plan convergence in the evolution of skates and rays (Chondrichthyes: Batoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **63**: 28–42.
- Botella H, Donoghue PC, Martinez-Perez C. 2009a.** Enameloïd microstructure in the oldest known chondrichthyan teeth. *Acta Zoologica (Stockholm)* **90**: 103–108.
- Botella H, Plasencia P, Marquez-Aliaga A, Cuny G, Dorka M. 2009b.** *Pseudodalatias henarejensis* nov. sp. a new pseudodalatiid (Elasmobranchii) from the Middle Triassic of Spain. *Journal of Vertebrate Paleontology* **29**: 1–7.
- Cappetta H. 1970.** Les Sélaciens du Miocène de la région de Montpellier. *Palaeovertebrata* **1970**: 1–139.
- Cappetta H. 1987.** Mesozoic and Cenozoic Elasmobranchii, Chondrichthyes II. In: Schultze HP, ed. *Handbook of paleoichthyology*. Stuttgart: Verlag F. Pfeil, 1–193.
- Cappetta H. 2006.** Elasmobranchii post-Triadici (index specierum et generum). *Fossilium Catalogus, I. Animalia Pars* **142**: 1–472.
- Cappetta H. 2012.** Mesozoic and Cenozoic Elasmobranchii: teeth, chondrichthyes. In: Schultze HP, ed. *Handbook of paleoichthyology*. Stuttgart: Verlag F. Pfeil, 1–512.
- Cappetta H, Stringer GL. 2002.** A new batoid genus (Neoselachii: Myliobatiformes) from the Yazoo Clay (Upper Eocene) of Louisiana, U.S.A. *Tertiary Research* **21**: 51–56.
- Carvalho MR. 1996.** Higher-level elasmobranch phylogeny, basal squalians, and paraphyly. In: Stassny MLJ, Parent LR, Johnson GD, eds. *Interrelationships of fishes*. San Diego: Academic Press, 35–62.
- Case GR, Tokaryk TT, Baird D. 1990.** Selachians from the Niobrara Formation of the Upper Cretaceous (Coniacian) of Carrot River, Saskatchewan, Canada. *Canadian Journal of Earth Sciences* **27**: 1084–1094.
- Cavin L. 2010.** On giant filter feeders. *Science* **327**: 968–969.
- Cicimurri DJ, Knight JL. 2009.** Late Oligocene sharks and rays from the Chandler Bridge Formation, Dorchester County, South Carolina, USA. *Acta Palaeontologica Polonica* **54**: 627–647.
- Claeson KM, O'Leary MA, Roberts EM, Sissoko F, Bouaref M, Tapanila L, Goodwin D, Gottfried MD. 2010.** First Mesozoic record of the stingray *Myliobatis wurnoensis* from Mali and a phylogenetic analysis of Myliobatidae incorporating dental characters. *Acta Palaeontologica Polonica* **55**: 655–674.
- Compagno LJV. 1973.** Interrelationships of living elasmobranchs. *Zoological Journal of the Linnean Society* **53** (Suppl. 1): 15–61.
- Compagno LJV. 1977.** Phyletic relationships of living sharks and rays. *American Zoologist* **17**: 303–322.
- Cuny G, Rieppel O, Sander PM. 2001.** The shark fauna from the Middle Triassic (Anisian) of North-Western Nevada. *Zoological Journal of the Linnean Society* **133**: 285–301.
- Cuny G, Risnes S. 2005.** The enameloïd microstructure of the teeth of Synchodontiform sharks (Chondrichthyes, Neoselachii). *PalArch* **3**: 8–19.
- Cuny G, Srisuk P, Khamha S, Suteethorn V, Tong H. 2009.** A new elasmobranch fauna from the middle Jurassic of southern Thailand. *Geological Society, London, Special Publications* **315**: 97–113.
- Dean MN, Bizzarro JJ, Summers AP. 2007.** The evolution of cranial design, diet and feeding mechanisms in batoid fishes. *Integrative and Comparative Biology* **47**: 70–81.
- Delsate D, Candoni LW. 2001.** Description de nouveaux morphotypes dentaires de Batomorphii toarciens (Jurassique

- inférieur) de Bassin de Paris: archaeobatidae nov fam. *Bulletin de la Société des Naturalistes Luxembourgeois* **102**: 131–143.
- Douady CJ, Dosay M, Mahmood SS, Stanhope MJ. 2003.** Molecular phylogenetic evidence refuting the hypothesis of Batoidea (rays and skates) as derived sharks. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **26**: 215–221.
- Gillis JA, Donoghue PCJ. 2007.** The homology and phylogeny of chondrichthyan tooth enameloid. *Journal of Morphology* **268**: 33–49.
- Ginter M, Hampe O, Duffin CJ. 2010.** Paleozoic Elasmobranchii: teeth, chondrichthyes. In: Schultze HP, ed. *Handbook of paleoichthyology*. Stuttgart: Verlag F. Pfeil, 1–168.
- Guinot G, Cappetta H. 2011.** Enameloid microstructure of some Cretaceous Hexanchiformes and Synchondontiformes (Chondrichthyes, Neoselachii): new structures and systematic implications. *Microscopy Research and Technique* **74**: 196–205.
- Holmgren N. 1941.** Studies on the head in fishes. Embryological, morphological and phylogenetical researches. Part II: comparative anatomy of the adult selachian skull, with remarks on the dorsal fins in sharks. *Acta Zoologica Stockholm* **22**: 1–100.
- Kriwet J, Kiessling W, Klug S. 2009.** Diversification trajectories and evolutionary life-history traits in early sharks and batoids. *Proceedings of the Royal Society B* **276**: 945–951.
- Lovejoy NR. 1996.** Systematics of myliobatoid elasmobranchs: with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae: Rajiformes). *Zoological Journal of the Linnean Society* **117**: 207–257.
- Maisey JG. 1985.** Cranial morphology of the fossil elasmobranch *Synechodus dubrisiensis*. *American Museum Novitates* **2804**: 1–28.
- Maisey JG, Naylor GJP, Ward DJ. 2004.** Mesozoic elasmobranchs, neoselachian phylogeny and the rise of modern elasmobranch diversity. In: Arratia G and Tintori A eds. *Mesozoic fishes 3 - Systematics, paleoenvironments and biodiversity*. München: Verlag F. Pfeil, 17–56.
- Marshall AD. 2009.** Biology and population ecology of *Manta birostris* in southern Mozambique. PhD Thesis, University of Queensland.
- Marshall AD, Compagno LJV, Benett MB. 2009.** Redescription of the genus *Manta* with resurrection of *Manta alfredi* (Krefft, 1868) (Chondrichthyes; Myliobatoidae; Mobulidae). *Zootaxa* **2301**: 1–28.
- McEachran JD, Dunn KA. 1998.** Phylogenetic analysis of skates, a morphologically conservative clade of elasmobranchs (Chondrichthyes: Rajidae). *Copeia* **2**: 271–290.
- McEachran JD, Dunn KA, Miyake T. 1996.** Interrelationships of the batoid fishes (Chondrichthyes: Batoidea). In: Stiassny MLJ, Parenti LR, Johnson GD, eds. *Interrelationships of fishes*. London: Academic Press, 63–82.
- Nishida K. 1990.** Phylogeny of the suborder Myliobatoidae. *Memoirs of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University* **37**: 1–108.
- Noubhani A, Cappetta H. 1997.** Les Orectolobiformes, Carcharhiniformes et Myliobatiformes (Elasmobranchii, Neoselachii) des bassins à phosphate du Maroc (Maastrichtien-Lutétien basal). Systématique, biostratigraphie, évolution et dynamique des faunes. *Palaeo Ichthyologica* **8**: 1–327.
- Preuschoft H, Reif WE, Müller WH. 1974.** Funktionsanpassungen in Form und Struktur an Haifiszähnen. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgechichte* **143**: 315–344.
- Purdy RW, Schneider VP, Applegate SP, McLellan JH, Meyer RL, Slaughter BH. 2001.** The Neogene sharks, rays, and bony fishes from Lee Creek Mine, Aurora, North Carolina in Geology and paleontology of the Lee Creek Mine, North Carolina, III, Clayton E. Ray & David J. Bohaska. *Smithsonian Contributions to Paleobiology* **90**: 71–202.
- Regan CT. 1906.** A classification of the selachian fishes. *Proceedings of the Zoological Society of London* **1906**: 722–758.
- Reif WE. 1973.** Morphologie und ultrastruktur des Hai-‘Schmelzes’. *Zoologica Scripta* **2**: 231–250.
- Reif WE. 1977.** Tooth enameloid as a taxonomic criterion. I. A new euselachian shark from the Rhaetic-Liassic boundary. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, Monatshefte* **1977**: 565–576.
- Reif WE. 1979.** Structural convergences between enameloid and actinopterygian teeth and of shark teeth. *Scanning Electron Microscopy* **2**: 546–554.
- Summers AP. 2000.** Stiffening the stingray skeleton—an investigation of durophagy in myliobatid stingrays (Chondrichthyes, Batoidea, Myliobatidae). *Journal of Morphology* **243**: 113–126.
- Summers AP, Koob TJ, Brainerd EL. 1998.** Stingray jaws strut their stuff. *Nature* **395**: 450–451.
- Thies D. 1982.** A neoselachian shark tooth from the lower Triassic of the Kocaeli (=Bithynian) Peninsula, W Turkey. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, Monatshefte* **1992**: 272–278.
- Underwood CJ. 2004.** Environmental controls on the distribution of neoselachian sharks and rays within the British Bathonian (Middle Jurassic). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeobiology* **203**: 107–126.
- Underwood CJ. 2006.** Diversification of the Neoselachii (Chondrichthyes) during the Jurassic and Cretaceous. *Paleobiology* **32**: 215–235.
- Underwood CJ, Cumbaa SL. 2010.** Chondrichthyans from a Cenomanian (Late Cretaceous) bonebed, Saskatchewan, Canada. *Palaeontology* **53**: 903–944.
- Underwood CJ, Ward DJ, King C, Antar SM, Zalmout IS, Gingerich PD. 2011.** Shark and ray faunas in the Middle and Late Eocene of the Fayum Area, Egypt. *Proceedings of the Geologists’ Association of London* **122**: 47–66.
- Winchell CJ, Martin AP, Mallatt J. 2004.** Phylogeny of Elasmobranchs based on LSU and SSU ribosomal RNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**: 214–224.

APPENDIX

List of fossil and extant specimens examined.

Taxon	Specimen	Origin	Age	No. of specimens examined	Sex	Complex
<i>Mobula thurstoni</i>	NS83-077	Un.	Modern	2	♂	A
<i>Mobula tarapacana</i>	NS83-161	Ivory Coast	Modern	2	♀	A
<i>Mobula mobular</i>	NS883	Algeria	Modern	1	♀	A
<i>Mobula munkiana</i>	NS82-028	Un.	Modern	1	♂	A
<i>Mobula japonica</i>	NS83-024	Un.	Modern	2	♂	A
<i>Manta birostris</i>	NS583-160	Un.	Modern	2	♀	A
<i>Rhinoptera</i> sp.	REC651M	Mexico	Modern	1	Un.	B
<i>Myliobatis</i> sp.	REC777M	Mexico	Modern	1	Un.	B
<i>Myliobatis aquila</i>	REC469M	Mediterranean	Modern	1	♀	B
<i>Aetobatus narinari</i>	REC42M	Red Sea	Modern	1	Un.	B
<i>Gymnura altavela</i>	REC522M	Ghana	Modern	2	♀	A
<i>Gymnura marmorata</i>	REC523M	California	Modern	1	♀	A
<i>Gymnura micrura</i>	REC518M	Un.	Modern	1	Un.	A
<i>Pteroplatytrygon violacea</i>	REC746M	Sète, France	Modern	2	♀	B
<i>Rhynchobatus</i> sp.	REC661M	Un.	Modern	2	Un.	B
<i>Raja clavata</i>	REC706M	Sète, France	Modern	2	♀	B
<i>Himantura uarnak</i>	REC784M	Un.	Modern	1	Un.	B
<i>Archaeomanta</i> sp.	UM	Kebar, Tunisia	Bartonian	2	Un.	A
<i>Rhinoptera</i> sp.	UM	Kebar, Tunisia	Bartonian	1	Un.	B
<i>Cretomanta canadensis</i>	UM-MID3	Agadir, Morocco	Turonian	2	Un.	–
<i>Aetobatus</i> sp.	UM	Km.55, Egypt	Upper Eocene	1	Un.	B
<i>Brachyrhizodus wichitaensis</i>	UM-HBR137-47	Big Brooks, USA	Maastrichtian	1	Un.	B
<i>Myliobatis raouxi</i>	UM	Morocco	Thanetian	1	Un.	B
<i>Plinthicus</i> sp.	UM	Lee Creek, USA	Miocene	1	Un.	A
<i>Oromobula daklhaensis</i>	UM	Samlat Formation, Morocco	Upper Eocene	1	Un.	A
<i>Eomobula</i> sp.	UM	Prémontré, France	Ypresian	1	Un.	?
<i>Burnhamia</i> sp.	UM	Prémontré, France	Ypresian	2	Un.	C
<i>Jacquhermania duponti</i>	UM	Prémontré, France	Ypresian	1	Un.	A
<i>Dasyatis</i> sp.	UM	Prémontré, France	Ypresian	1	Un.	B
<i>Gymnura</i> sp.	UM	St Georges d'Orque, France	Burdigalian	1	Un.	A

Un., unknown. REC and UM indicate that material is housed at the University of Montpellier 2. NS indicates that material is referenced by G. Notarbartolo di Sciara and temporarily deposited at the University of Montpellier 2.

Quatrième partie .

**Développement dentaire chez les
néosélaciens**

15. Développement et composition des tissus dentaires

La dentition des néosélaciens est caractérisée par un renouvellement dentaire unique, fonctionnant à la manière d'un tapis roulant, ce qui en fait un modèle idéal pour étudier des problématiques liées au renouvellement dentaire et à l'odontogénèse. Leurs dents se développent sur la face interne du cartilage de Meckel, sous la lame dentaire, un repli épithélial recouvrant les bourgeons dentaires avant de migrer en position fonctionnelle puis d'être perdues et remplacées (Kemp, 1999; Smith et al., 2009, 2012). La durée de ce processus peut varier de manière importante en fonction des espèces et de certains paramètres tels que l'âge et la température de l'eau (e.g. Belleggia et al., 2014; Luer et al., 1990).

Étant donné la nature fragmentaire de leur registre fossile, les tissus dentaire des chondrichthyens ont été largement utilisés dans un contexte évolutif par de nombreux paléontologues (e.g. Thomasset, 1930; Radinsky, 1961; Reif, 1973), malgré des origines développementales et des relations d'homologie incertaines avec les tissus hyperminéralisés existant chez d'autres vertébrés (Kawasaki, 2009a). Chez les tétrapodes, la nature des tissus dentaires est relativement bien connue. Les dents sont principalement constituées

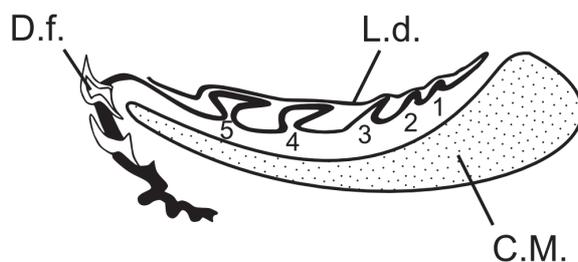


FIGURE 21. – Section schématique réalisée dans la mâchoire inférieure d'un requin. Deux dents fonctionnelles sont visibles, ainsi que cinq bourgeons dentaires à différents stades de développement situés sous la lame dentaire. Modifié d'après Peyer (1968) et Zangerl et al. (1993).

15. Développement et composition des tissus dentaires

de dentine, un tissu proche de l'os, riche en collagène et déposé par les odontoblastes, des cellules qui se différencient à partir de mésenchyme envahi de cellules de la crête neurale (Arana-Chavez & Massa, 2004; Sharpe, 2001). Il existe plusieurs types de dentine, décrits sur des critères histologiques et morphologiques, et dont certains peuvent être particulièrement difficiles à distinguer de l'os (e.g. Hall, 2005; Radinsky, 1961). La dentine de la racine de la dent est recouverte de cément, un autre tissu minéralisé parfois qualifié d'« intermédiaire » (Hall, 2005), déposé par des cémentoblastes, des cellules également issues du mésenchyme peuplé de cellules de la crête neurale. La couronne est recouverte d'émail, un tissu hyperminéralisé dont la matrice protéique est secrétée par les améloblastes. Ces cellules se différencient à partir de l'épithélium dentaire interne (IDE, *Inner Dental Epithelium*), issu du repliement de la lame dentaire formant l'IDE et l'ODE (*Outer Dental Epithelium*) (Huysseune & Sire, 1998; Tucker & Sharpe, 2004). La matrice de l'émail, dépourvue de collagène, est en revanche caractérisée par des EMP (*Enamel Matrix Proteins*), des protéines telles que l'amélogénine, l'énaméline, la tuftéline ou l'amélotine (Gasse et al., 2015; Kawasaki, 2009a) qui sont probablement impliquées dans la nucléation et l'élongation des cristaux d'hydroxyapatite de l'émail au cours du processus de maturation (Arends et al., 1983; Zeicher-David et al., 1995).

La structure générale des dents de chondrichthyens (exception faite des plaques dentaires des chimères et de quelques cas particuliers qui ne seront pas abordés ici) est assez similaire, avec une couronne constituée de dentine pouvant entourer une cavité pulpaire, et recouverte par un tissu hyperminéralisé, l'émailloïde. Comparé à l'émail, son origine cellulaire et la composition de sa matrice demeurent cependant bien plus énigmatiques. En effet, si les deux tissus présentent des ressemblances superficielles avec l'émail des tétrapodes, ce qui est notamment dû à leur fonction et à leur position, ils ne sont toutefois pas considérés comme des structures homologues compte tenu des différences importantes existant dans la composition de leur matrice protéique respective, dans les patrons de minéralisation de ces dernières, et dans la microstructure des tissus fonctionnels (Gillis & Donoghue, 2007; Kemp, 1999; Miyake et al., 1999).

L'essentiel des controverses entourant l'émailloïde portent sur deux points principaux : son origine cellulaire d'une part, et la nature de sa matrice protéique d'autre part, des questions qui sont débattues depuis plus d'un siècle (Cappetta, 2012; Peyer, 1968; Prostat & Skobe, 1988b). L'utilisation du terme d'émailloïde (Orvig, 1967; Poole, 1967, 1971)

15. Développement et composition des tissus dentaires

est problématique en soi dans la mesure où il a d'abord été introduit afin de différencier les tissus hyperminéralisés des mammifères et des « poissons » au sens général, sans implications quant à son origine développementale ou la composition de sa matrice protéique (Kemp, 1985; Prostack et al., 1990). De ce fait, ce terme est parfois employé pour désigner des tissus non homologues (Zangerl et al., 1993).

L'implication des odontoblastes dans la synthèse de la matrice protéique de l'émailloïde est établie depuis longtemps (Grady, 1970; Kvam, 1950; Peyer, 1968; Tomes, 1898), ce qui a mené certains auteurs à considérer qu'il puisse s'agir d'une forme particulièrement indurée de dentine, appelée alternativement « durodentine » (Lübke et al., 2015; Mader, 1986; Schmidt, 1958), « vitrodentine » (Owen, 1840; Zangerl et al., 1993), « émail mésodermique » (Kvam (1946; 1950)) ou encore « coronoïne » (Bendix-almgreen, 1983). Ces problèmes de terminologie sont issus de plusieurs hypothèses liées aux origines développementales de ce tissu existant dans la littérature (Prostack & Skobe, 1988a; Sasagawa & Akai, 1992) qui proposent que sa matrice soit : i) caractérisée par une protéine non-collagénique sécrétée par les odontoblastes et dont la trame organique est minéralisée par les améloblastes (Tomes, 1898) ; ii) de nature collagénique, sécrétée par les odontoblastes et minéralisée par les améloblastes (Kerebel et al., 1974; Grady, 1970) ; iii) partiellement constituée de collagène qui interfère avec des protéines sécrétées par les améloblastes avant la minéralisation de la trame organique (Poole, 1971; Poole & Gillett, 1969; Shellis, 1978) ; iv) composée de tubules d'énaméline, sécrétés par les améloblastes et formant des « fibres géantes » (Kemp, 1985) et v) une variante de cette hypothèse propose que si les « structures tubulaires » sont bien d'origine épithéliale, les « fibres géantes » sont en revanche produites par les odontoblastes (Goto, 1978; Prostack & Skobe, 1988a; Prostack et al., 1990).

Toutes les hypothèses se basant sur l'existence d'une matrice collagénique considèrent que celle-ci est d'origine ectomésenchymale. Or, il a été montré plus récemment que les améloblastes étaient également capable de synthétiser du collagène chez des urodèles et chez des téléostéens (Assaraf-Weill et al., 2014; Huysseune et al., 2008; Kawasaki et al., 2005; Kawasaki, 2009a). Une hypothèse assez récurrente lorsque la possibilité d'une matrice protéique non-collagénique est abordée est la présence d'une protéine fibreuse de type kératine (*keratin-like*, *pseudokeratin*) (Everett & Miller, 1981; Kawasaki et al., 1980; Prostack & Skobe, 1988a). L'ensemble de ces hypothèses illustre donc bien les

15. Développement et composition des tissus dentaires

nombreuses incertitudes demeurant quant à la nature et au développement de ce tissu. Plus récemment, la description d'une diversité importante de microstructures chez certains chondrichthyens (Guinot & Cappetta, 2011; Guinot et al., 2013; Enault et al., 2015a) indique la nécessité d'une meilleure compréhension des processus développementaux à l'origine de ce tissu avant qu'il ne soit possible de clarifier ses relations évolutives avec les autres tissus hyperminéralisés existant au sein des gnathostomes. Dans ce contexte, il faut donc considérer deux points : i) la composition de la matrice de l'émailloïde, et ii) la contribution respective des améloblastes et des odontoblastes dans la formation de ce tissu.

Pour tenter d'apporter de nouveaux éléments de réponse à ces questions, cette partie se focalise sur le développement dentaire de la petite roussette (*Scyliorhinus canicula*), appartenant aux Carcharhiniformes, et de deux espèces de raies (*Raja clavata* et *Raja asterias*) appartenant aux Rajiformes, ce qui doit permettre de fournir un cadre comparatif à l'échelle des néosélaciens. Le développement dentaire sera donc abordé dans un contexte morphologique dans un premier temps, grâce à une série de marquages histologiques et d'observations réalisées en microscopie électronique à transmission, puis dans un contexte moléculaire. En effet, si les tissus dentaires des chondrichthyens ont été relativement bien étudiés à l'aide d'outils analytiques « classiques » (e.g. microscopie optique, électronique, cristallographie aux rayons-X), ils ont en revanche peu été examinés avec des outils moléculaires modernes. Le dernier chapitre de cette partie sera donc consacré à une approche moléculaire de l'odontogénèse, via la description de patrons d'expression de gènes sélectionnés pour leur intérêt potentiel dans la mise en place de l'émailloïde. L'ensemble de cette partie doit donc apporter de nouveaux éléments sur la formation de l'émailloïde en combinant des données histologiques, ultrastructurales et transcriptionnelles.

16. Histologie et ultrastructure

Le développement de la dentition et des denticules dermiques des néosélaciens est remarquablement similaire et passe par les mêmes étapes successives, qu'ils partagent également avec les dents orales et pharyngiennes des ostéichthyens (Borday-Birraux et al., 2006; Debiais-Thibaud et al., 2007, 2011; Miyake et al., 1999), illustrées par la figure 22.

Leur développement débute par le stade EM (*Early Morphogenesis*, figure 22-A) avec la formation d'une placode : un épaissement de l'épithélium associé à une condensation du mésenchyme sous-jacent. L'épithélium dentaire se plie ensuite progressivement résultant dans la formation d'un bourgeon dentaire, ce qui caractérise le stade LM (*Late Morphogenesis*, figure 22-B). Le troisième stade, ED (*Early Differentiation*, figure 22-C) est marqué par un resserrement de l'épithélium à la base du bourgeon dentaire. Enfin, le stade LD (*Late Differentiation*, figure 22-D) est caractérisé par des améloblastes bien différenciés (noyau déporté dans la zone apicale, nombreuses vésicules sécrétrices) et le début de dépôt de la matrice extra-cellulaire. Celle-ci est principalement constituée par des protéines fibreuses et des glycosaminoglycanes, molécules sécrétées par les améloblastes et les odontoblastes (Alberts et al., 2002). L'activité sécrétrice des odontoblastes n'est en revanche pas caractérisée par une morphologie cellulaire distincte.

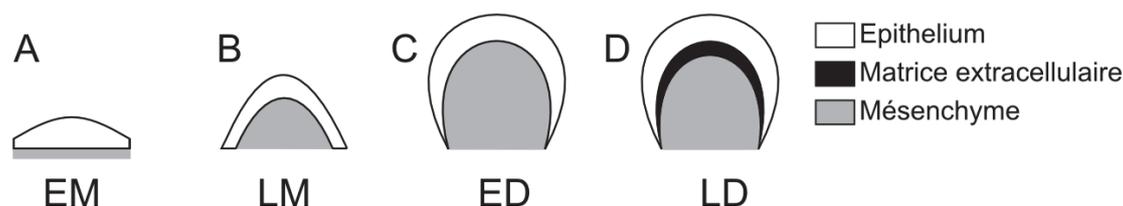


FIGURE 22. – Stades développementaux schématisés des structures odontoïdes. **A** : EM (*Early Morphogenesis*) : formation d'une placode et condensation du mésenchyme. **B** : LM (*Late Morphogenesis*) : formation du bourgeon dentaire. **C** : ED (*Early Differentiation*) : constriction de l'épithélium à la base du bourgeon dentaire. **D** : LT (*Late Differentiation*) : différenciation des améloblastes et sécrétion de la matrice extra-cellulaire. Modifié d'après Debiais-Thibaud et al. (2011).

16.1. Histologie

La dentition unique des néosélaciens, constituée de dents associées en files continues, est particulièrement favorable à l'étude de leur développement dentaire. Cette caractéristique permet d'accéder à plusieurs stades développementaux sur une même coupe, depuis les premiers bourgeons dentaires jusqu'aux dents fonctionnelles. De ce fait, beaucoup de travaux consacrés au développement dentaire chez les chondrichthyens figurent des coupes histologiques, permettant la description de la morphologie de ces différents éléments de manière simultanée, que ce soit chez des individus adultes ou des embryons. La plupart de ces travaux sont toutefois publiés en noir et blanc, ce qui ne nuit pas à la description morphologique des tissus, mais complique considérablement leur interprétation si des colorations spécifiques sont utilisés. D'autre part, à l'exception des travaux de Peyer (1968) qui a examiné le développement dentaire au sein de plusieurs groupes, la plupart se placent rarement dans un contexte comparatif, et se focalisent généralement sur une seule espèce.

Cette section détaille plusieurs marquages histologiques réalisés sur des mâchoires de *S. canicula*, *R. asterias* et *R. clavata*, à la fois chez des individus adultes ou subadultes et chez des embryons. Des colorations ont également été effectuées sur des coupes transversales dans le tronc ou la région caudale de ces mêmes spécimens, ce qui permet d'avoir accès aux denticules dermiques en développement, ou déjà fonctionnels, fournissant ainsi un contrôle pour les observations réalisées sur la dentition. Des coupes supplémentaires ont aussi été réalisées chez quelques autres sélaciens appartenant à d'autres ordres : deux squaliformes : *Squalus acanthias* et *Etmopterus* cf. *spinax* pour les requins et un myliobatiforme : *Mobula japonica* pour les raies afin de vérifier dans quelle mesure les données obtenues chez *S. canicula* et le genre *Raja* sont éventuellement extrapolables à d'autres néosélaciens.

Quatre colorations histologiques sont utilisées sur les échantillons présentés, dont les propriétés sont rappelées ici :

- Le marquage Hématoxyline-Eosine-Safran (HES) qui colore en violet les noyaux cellulaires, en rose le cytoplasme des cellules et en rose-orangé les fibres de collagène. Cette coloration n'a pas de spécificité pour un type de collagène particulier.
- Le marquage *Periodic Acid Schiff* (PAS) permet principalement la mise en évi-

16. Histologie et ultrastructure

dence des membranes basales et de macromolécules glucidiques, en particulier des glycosaminoglycanes neutres, qui sont colorés en magenta. Cette coloration peut éventuellement être couplée à du bleu alcian (PAS-BA) qui colore en bleu turquoise les glycosaminoglycanes acides et certaines glycoprotéines. Ces propriétés en font un excellent colorant des tissus cartilagineux.

- Le marquage Réticuline (RET) marque les fibres de réticuline (collagène de type III) en noir, et les autres types de collagène en marron sans distinction entre ces derniers.
- Le Trichrome de Masson (TM) colore les noyaux cellulaires en violet sombre, le cytoplasme des cellules en violet rouge foncé et les fibres de collagène en bleu, tout type confondu.

Si les différents marquages utilisés permettent difficilement de faire la distinction entre différents types de collagène, ils permettent en revanche une première approche du contenu de la matrice extra-cellulaire des bourgeons dentaires et des denticules dermiques. Les échantillons utilisés pour les colorations histologiques doivent être déminéralisés au cours du processus, ce qui ne permet pas de quantifier la minéralisation des structures d'intérêt. Pour pallier à ce problème, certaines coupes de mâchoire, réalisées en cryosection non déminéralisées, ont été colorées au bleu alcian et au rouge d'alizarine, permettant ainsi la mise en évidence des zones calcifiées.

Dentition de *S. canicula*, juvénile

La figure 23 illustre le développement dentaire chez un spécimen juvénile de *S. canicula* (figure 23-A) . Le cartilage de Meckel est bien visible au centre de la coupe, et plusieurs dents sont en position fonctionnelle. Une série de denticules dermiques, présentant une couronne arrondie, est également présente sur la face ventrale de la coupe. Deux bourgeons dentaires sont bien visibles et un troisième, plus âgé, est coupé partiellement, ce qui est dû à l'organisation en quinconce de la dentition de *S. canicula*. L'agrandissement du premier bourgeon dentaire, à un stade LD assez précoce (figure 23-B-E'), révèle des améloblastes qui présentent une morphologie pouvant être associée à une activité de sécrétion (le noyau déporté dans la zone apicale de la cellule, en particulier au niveau de la cuspide et des faces latérales de la couronne. Les odontoblastes les plus proches de la cuspide

16. Histologie et ultrastructure

présentent déjà des expansions cytoplasmiques (processus odontoblastiques) s'enfonçant profondément dans la matrice extra-cellulaire et sont particulièrement denses à la base de celle-ci (figure 23-B', flèche jaune). Le dépôt initial de matrice extra-cellulaire, légèrement coloré de rose, est visible au niveau de la cuspidé, à l'interface entre les améloblastes et les premiers odontoblastes. Le PAS-BA colore faiblement en magenta la zone de transition entre le dépôt initial de matrice et les améloblastes, ce qui correspond probablement à la lame basale de ces derniers (figure 23-C, C'). La réticuline met en évidence la présence ténue de collagène III au niveau des processus de certains odontoblastes (figure 23-D, D', flèches jaunes), et la zone de transition entre les odontoblastes et les améloblastes est colorée en marron, ce qui indique la présence de collagène. Enfin, le marquage au Trichrome de Masson colore de manière diffuse la matrice extra-cellulaire en gris-bleu (figure 23-E, E').

Le second bourgeon dentaire correspond à un stade plus tardif de LD (figure 23-B''-E''). Les améloblastes sont moins allongés apico-basalement que dans le bourgeon précédent et leur noyau n'est plus déporté dans la zone apicale de manière aussi marquée. Les odontoblastes sont bien différenciés et leurs processus s'enfoncent profondément dans la couche de dentine jusqu'à la couche d'émailloïde. La dentine présente déjà une épaisseur importante, ce qui indique qu'elle se développe rapidement entre ces deux stades après le dépôt initial de la matrice de l'émailloïde. Elle est marquée en rose-orangé (HES), marron (RET) et bleue (TM) ce qui indique la présence importante de collagènes autres que du collagène de type III, qui n'est pas mis en évidence par le marquage réticuline (figure 23-D''). L'émailloïde est bien visible, bien qu'il ne soit plus marqué par aucune des colorations utilisées ici, car probablement déjà minéralisé à ce stade.

L'interface entre les couches d'émailloïde et de dentine apparaît riche en collagène, ce qui est bien illustré par les marquages HES et TM (figure 23-B'', E'', flèches jaunes). Cette zone de transition n'est toutefois pas colorée de la même manière que la dentine au PAS-BA où elles apparaissent en bleu-violet alors que le reste de la dentine est en rose pâle (figure 23-C''), une situation qui est particulièrement visible sur les dents fonctionnelles (figure 23-C*, flèche jaune).

Denticules dermiques de *S. canicula*, juvénile

La figure 24 illustre une section transversale réalisée dans la région caudale d'un spécimen juvénile de *S. canicula*. Les téguments sont recouverts par de nombreux denticules dermiques (figure 24-A). La plupart sont fonctionnels mais plusieurs bourgeons à différents stades de développement sont également visibles. Trois stades ont été sélectionnés pour les colorations : des bourgeons correspondant à un stade ED tardif (figure 24-B-E), un bourgeon au stade LD avec dépôt initial de matrice extra-cellulaire (figure 24-B'-E') et un denticule dermique fonctionnel (figure 24-B''-E'').

Le premier bourgeon de denticule dermique (figure 24-B-E) est un stade antérieur au plus jeune bourgeon de la dentition décrite dans la section précédente. Les améloblastes sont allongés mais ne présentent pas encore de vésicules de sécrétion. Un mince espace est visible à l'interface entre les deux populations de cellules, coloré en noir par la réticuline (figure 24-D), et correspond à la lame basale.

Le second bourgeon (figure 24-B'-E') est recouvert par des améloblastes bien différenciés, présentant une morphologie sécrétrice. La matrice de l'émailloïde est visible, faiblement colorée (indiquée par une flèche rouge sur la figure 24-E'), et une partie de la dentine (ou pré-dentine) est également visible, bien mise en évidence par les colorations RET et TM (indiquée par une flèche jaune sur la figure 24-E'). Ces résultats correspondent aux données obtenues dans la dentition, qui indiquent que si la dentine et sa matrice semblent riches en collagène, et ce également après minéralisation (compte tenu de la coloration intense de la dentine des dents et des denticules dermiques fonctionnels), l'émailloïde en est beaucoup plus faiblement pourvu. En effet, la coloration de sa matrice est très diffuse voire absente sur les stades plus tardifs, où elle est uniquement limitée aux structures fibreuses visibles à l'interface avec la dentine.

Les denticules fonctionnels (figure 24-B''-E'') présentent une dentine massive, fortement colorée par tous les marquages ce qui indique une quantité importante de collagènes et en moindre quantité, de composés glucidiques ou glycosylés (coloration magenta au PAS-BA).

Dentition de *S. canicula*, embryon

La figure 25-A-E illustre la dentition embryonnaire de *S. canicula*. La coupe longitudinale de mâchoire a été réalisée sur un embryon de 7 cm et on peut y observer trois bourgeons dentaires à différents stades de développement, ainsi que deux dents plus âgées, partiellement visibles. Aucune dent fonctionnelle n'est présente. Le bourgeon le plus jeune est encore au stade EM sur la coupe colorée au HES (figure 25-A, B) et donc difficile à distinguer. Il est mieux visible avec les autres colorations (en particulier avec la coloration PAS-BA (figure 25-C, flèche jaune). L'encart figuré en A' illustre une coupe transversale de mâchoire réalisée chez un spécimen plus âgé, mesurant 9 cm et coloré au bleu alcian et au rouge d'alizarine, ce dernier permettant de visualiser les tissus calcifiés. Bien qu'effectuée sur un spécimen plus âgé, la coloration permet de voir que les deux premiers bourgeons ne sont pas (où très peu dans le cas du bourgeon 2) minéralisés. Sur la figure 25-B le second bourgeon dentaire correspond à un stade LD, et la matrice de l'émailloïde est déjà visible. Une partie des améloblastes présente une morphologie sécrétrice, mais les odontoblastes semblent peu différenciés. Les autres colorations donnent des informations similaires bien que les colorations TM et RET (figure 25-D, E) soient trop sombres pour être facilement interprétables.

La coloration PAS-BA est particulièrement intéressante ici dans la mesure où la matrice de l'émailloïde est colorée en bleu turquoise (indiquant la présence de glycosaminoglycanes acides) (figure 25-C, flèche rouge), ce qui n'était pas observable dans les bourgeons dentaires et de denticules dermiques du spécimen juvénile (figures 23-C, C' et 24-C'). Le troisième bourgeon dentaire est plus âgé présente déjà une dentine bien développée (figure 25-B, D) et une quantité importante de fibres est visible à l'interface avec la couche d'émailloïde, particulièrement avec le marquage RET (figure 25-D, flèche jaune). En dehors des bourgeons dentaires plus jeunes et de la coloration de la matrice de l'émailloïde du second bourgeon par le bleu alcian, l'ensemble de ces observations est concordante avec les résultats obtenus sur la dentition et les denticules dermiques du spécimen juvénile.

Denticules dermiques de *S. canicula*, embryon

Les embryons de *S. canicula* possèdent deux rangées de denticules dermiques de grande taille situés dans la région dorsale, qui sont les premiers à se développer au cours de l'embryogenèse avec d'autres denticules situés au niveau de la nageoire caudale. Les coupes transversales réalisées dans la région troncale permettent de mettre en évidence ces denticules (figure 25-F, F') qui sont déjà bien développés bien que pas encore sortis de l'épiderme. Seule la coloration HES est présentée (figure 25-F') et illustre des améloblastes dont le noyau n'est pas déporté dans la zone apicale. Les odontoblastes possèdent des processus cytoplasmiques importants. La couche de dentine, bien visible, entoure une large cavité pulpaire, et une très fine couche d'émailloïde, difficile à distinguer sur les images, est présente à sa surface.

Dentition de *R. asterias*, adulte

Contrairement à *S. canicula*, dont les dents sont organisées en quinconce, la dentition des deux espèces du genre *Raja* étudiées au cours de ce travail est organisée en files dentaires continues, ce qui facilite considérablement l'observation des bourgeons dentaires puisqu'ils sont presque tous observables sur une coupe unique (figure 26-A). Le premier bourgeon dentaire (figure 26-B-E) correspond à un stade précoce de LM : les améloblastes sont différenciés et présentent une morphologie sécrétrice avec leurs noyaux déportés dans la zone apicale des cellules (figure 26-B'-E'). Les processus cytoplasmiques des odontoblastes sont clairement visibles et s'enfoncent profondément dans la matrice de l'émailloïde sans toutefois parvenir au contact des améloblastes. La coloration PAS (sans BA dans cette série de coupe) marque spécifiquement les améloblastes et leur membrane basale (figure 26-C) ce qui indique une activité de sécrétion de composés polysaccharidiques ou de glycosaminoglycanes, qui peuvent être en relation avec la maintien de la lame basale ou bien avec une sécrétion dans l'espace séparant les odontoblastes de la lame basale. La coloration TM permet de bien visualiser les prolongements des odontoblastes dans la matrice de l'émailloïde qui est faiblement marquée par les colorations utilisées. La réticuline permet par contre de mettre en évidence une coloration noire, indicatrice de la présence de collagène de type III non seulement dans les cellules de l'épithélium mais également dans les processus odontoblastiques, polarisés vers la matrice de l'émailloïde (figure 26-D'). Ce marquage est d'ailleurs beaucoup plus visible dans la même zone au sein de bourgeons plus tardifs (figure 26-D'').

Le troisième bourgeon de la série (figure 26-B''-E''), appartenant à une file dentaire adjacente, présente une épaisseur importante de dentine riche en collagène. Sa morphologie est très comparable aux observations réalisées sur la dentition de *S. canicula* à deux différences près : d'une part la zone fibreuse située à l'interface entre la dentine et l'émailloïde s'enfonce moins profondément dans ce dernier. Elle est associée à un marquage bleu-gris au HES, un marquage noir à la réticuline, et bleu au TM ce qui indique donc la présence de collagènes (figure 26-D'', flèche jaune). D'autre part la dentine emprisonne manifestement plus de processus odontoblastiques, bien visibles sur les coupes colorées au TM (figure 26-E'', flèche jaune). Les odontoblastes sont bien visibles, ce qui n'est pas le cas de l'épithélium, abimé sur certaines coupes mais qui ne semble avoir aucune activité de

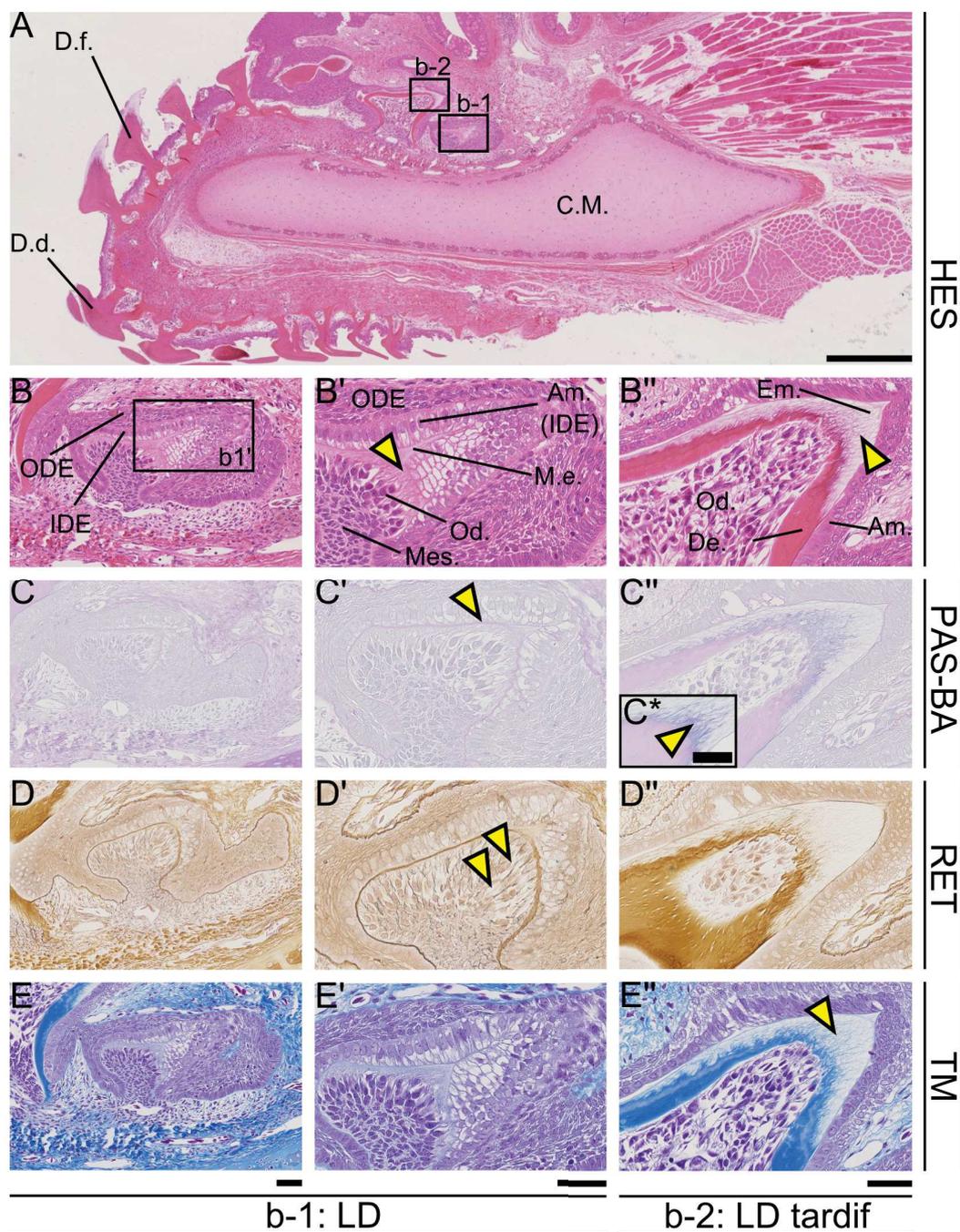


FIGURE 23. – Série dentaire de *S. canicula* (juvénile, 20 cm). **A** : coupe longitudinale de la mâchoire inférieure illustrant des denticules dermiques, des dents fonctionnelles, et plusieurs bourgeons dentaires. b-1 : bourgeon 1, stade LD. b-3 : bourgeon 2, stade LD plus tardif. Marquage : HES. Échelle : 500 μ m. **B-E** : bourgeon 1 coloré au HES, PAS-BA, Réticuline et Trichrome de Masson. **B'-E'** : agrandissement de la cuspide du premier bourgeon. **B''-E''** : agrandissement de la cuspide du troisième bourgeon. Échelles : 50 μ m. **C*** : agrandissement de la cuspide d'une dent fonctionnelle. Échelle : 50 μ m.

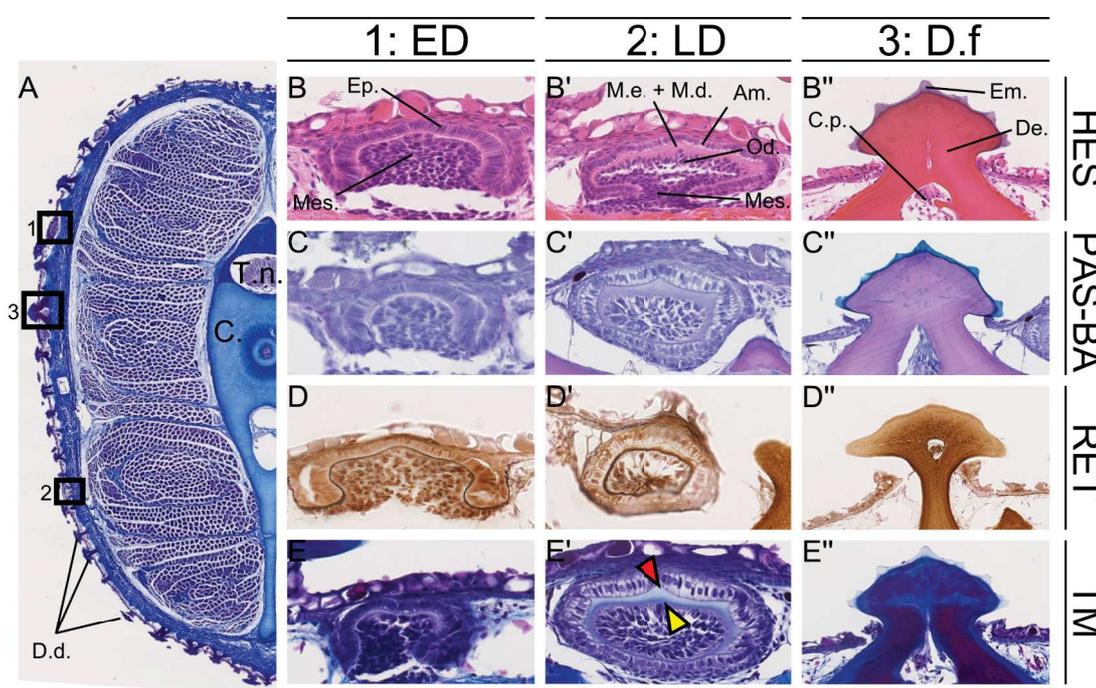


FIGURE 24. – Denticules dermiques de *S. canicula* (juvénile, 20 cm). **A** : coupe transversale dans la région caudale, illustrant l'épiderme recouvert de denticules dermiques à divers stades de développement. 1 : bourgeon 1, stade ED tardif; 2 : bourgeon 2, stade LD tardif; 3 : denticule dermique fonctionnel. Marquage : Trichrome de Masson. Échelle : 1 mm. **B-D** : bourgeon 1 coloré au HES; PAS-BA, Réticuline et Trichrome de Masson. **B'-E'** : bourgeon 2. **B''-E''** : denticule dermique fonctionnel. Échelles : 50 μ m.

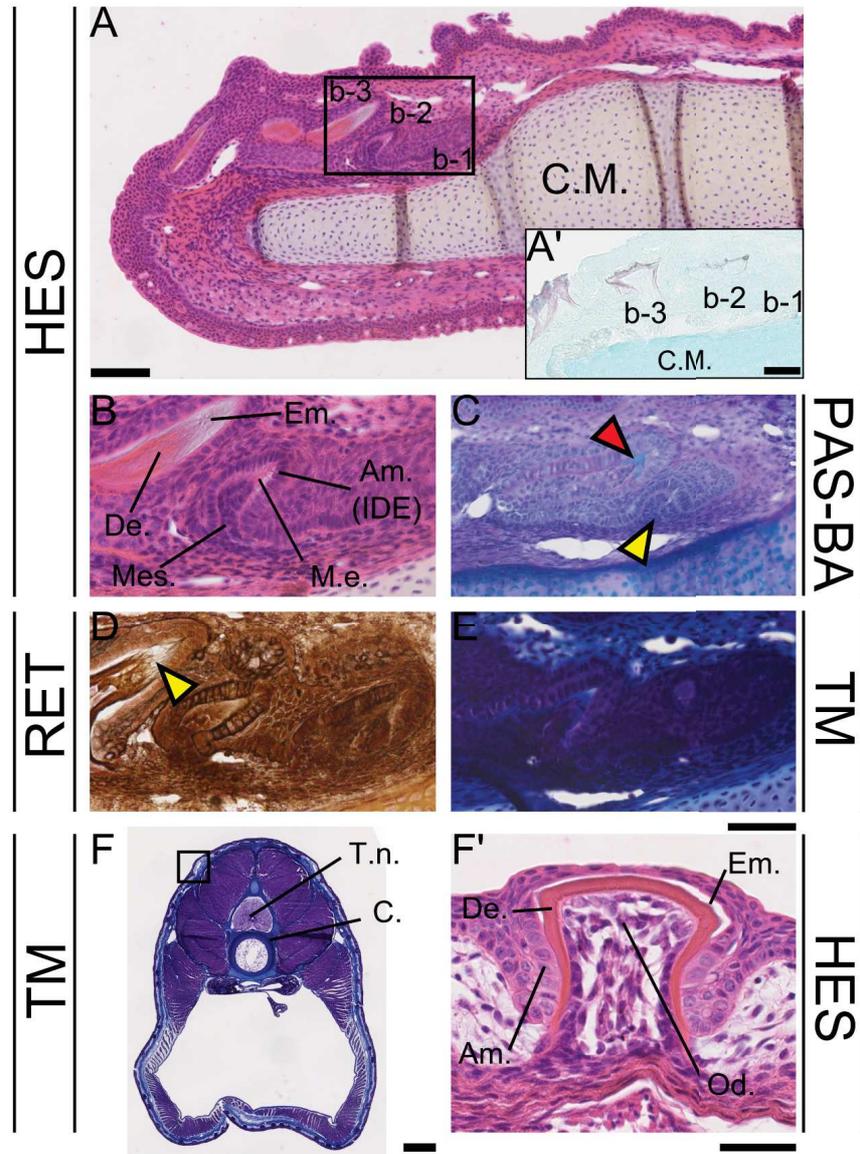


FIGURE 25. – Série dentaire et denticules dermiques de *S. canicula* (embryon, 8 cm). **A** : coupe longitudinale de la mâchoire inférieure illustrant plusieurs bourgeons dentaires. b-1-3 : bourgeons dentaires 1 à 3, aux stades ED (b-1), LD (b-2) et LD tardif (b-3). Marquage : HES. Échelle : 100 μ m. **A'** : coupe longitudinale de la mâchoire inférieure d'un embryon (9 cm) coloré au bleu alcian et rouge d'alizarine, illustrant la minéralisation précoce de la couronne. Échelle : 100 μ m. **B-E** : agrandissements de la zone encadrée en A, colorée au HES, PAS-BA, Réticuline et Trichrome de Masson. Échelle : 50 μ m. **F** : coupe transversale dans le tronc d'un embryon marqué au Trichrome de Masson. La zone encadrée indique un denticule dermique. Échelle : 500 μ m. **F'** : agrandissement d'un denticule dermique. Marquage : HES. Échelle : 50 μ m.

sécrétion.

Denticules dermiques de *R. asterias*, adulte

Les Rajiformes possèdent souvent des denticules dermiques de taille particulièrement importante (boucles dermiques) répartis dans la région rostrale et organisés en une ou plusieurs rangées le long de l'axe antéro-postérieur (ces denticules se développent également sur les nageoires pectorales des mâles de certaines espèces). Des sections transversales ont été réalisées dans la région caudale d'un spécimen adulte de *R. asterias* au niveau de l'un de ces denticules, bien visible dans la figure 27-F. Ces denticules présentent une épaisseur importante de dentine, possédant les mêmes caractéristiques histologiques que les dents et les denticules dermiques des espèces décrites dans les sections précédentes. Ils sont enchâssés dans le derme juste au dessus de l'arc neural de la vertèbre. Le sommet des denticules dermiques est recouvert par une fine couche d'émailloïde (figure 27-F'), et l'interface entre les deux tissus, bien que peu visible sur la figure, présente les mêmes caractéristiques que les dents et denticules dermiques précédemment décrits.

Dentition de *R. clavata*, embryon

La coupe longitudinale réalisée dans la mâchoire inférieure d'un embryon de *R. clavata* permet l'observation de trois bourgeons dentaires en succession (figure 27-A). La dentine est déjà clairement visible dans les deux bourgeons les plus âgés, qui possèdent également une cavité pulpaire importante. L'encart A' de la même figure illustre une coupe longitudinale réalisée dans la mâchoire d'un embryon de taille similaire et coloré au bleu alcian et rouge d'alizarine, ce qui permet de vérifier la minéralisation des bourgeons dentaires. Seul le premier bourgeon n'est pas minéralisé, les deux suivants étant bien marqués par le rouge d'alizarine.

Le premier bourgeon dentaire (figure 27B-E) correspond à un stade LD puisqu'une partie de la matrice extra-cellulaire est déjà visible. Les améloblastes sont fortement marqués par le PAS-BA qui colore leur cytoplasme en magenta (figure 27-C), ce qui concorde avec les observations réalisées chez *R. asterias* (figure 26-C, C'). Ils présentent une morphologie sécrétrice avec un noyau déporté dans la zone apicale de la cellule. Le marquage au

16. Histologie et ultrastructure

TM montre une coloration bleue visible dans la partie basale de la matrice extra-cellulaire (27-E).

Les améloblastes du second bourgeon dentaire (27-B'-E'), plus âgé, ne sont plus marquées par le PAS-BA, ce qui correspond aux données obtenues chez *R. asterias* et *S. canicula*. Les odontoblastes sont bien différenciés et remplissent la cavité pulpaire. La dentine est particulièrement bien marquée et présente les mêmes caractéristiques histologiques que celle de *S. canicula* et *R. asterias*. L'émailloïde, visible à la surface de la dentine est particulièrement fin à l'exception de la partie apicale de la cuspide.

Denticules dermiques de *R. clavata*, embryon

Des coupes transversales ont également été réalisées dans la région caudale du même embryon pour accéder aux denticules en cours de développement (figure 27-F, F'). Une base de dentine est clairement visible, située très profondément dans le derme. Des odontoblastes épars sont visibles sous la dentine (figure 27-F') mais la position des coupes, passant probablement sur un des bords du denticule ne permet pas d'observer l'épithélium et la couche d'émailloïde.

Dentition de quelques autres néosélaciens

Des marquages histologiques réalisés sur la dentition de trois espèces de néosélaciens supplémentaires sont présentées dans la figure 28. Deux requins squaliformes y sont figurés : *Squalus acanthias* (figure 28-A-E') et *Etmopterus cf. spinax* (figure 28-F-J). La dentition inférieure de ces espèces n'est pas organisée en quinconce comme c'est le cas pour *S. canicula*, et si moins de dents fonctionnelles sont visibles, un nombre plus important de bourgeons dentaires peuvent être observés sur une même coupe. Les observations réalisées chez ces deux espèces sont concordantes avec les résultats obtenus chez *S. canicula*, *R. asterias* et *R. clavata*. Quelques éléments peuvent toutefois être soulignés. D'une part, certains améloblastes du second bourgeon dentaire de *S. acanthias* présentent une coloration magenta avec le marquage PAS-BA (figure 28-C, flèche jaune), ce qui concorde avec les observations réalisées chez *Raja*, mais pas chez *Scyliorhinus*. Le second élément notable est le marquage de l'émailloïde par le bleu alcian sur ces mêmes colorations chez *Squalus* et chez *Etmopterus* (figure 28-C', H), ce qui correspond à certaines observations réalisées chez *Scyliorhinus* (figure 25-C) mais n'a pu être mis en évidence sur aucune des coupes de *Raja*.

La figure 28-K-K'' illustre également une série dentaire de *Mobula japonica*, un myliobatiforme planctonophage dont la morphologie dentaire n'est pas aussi spécialisée que celle de *Manta*. La série dentaire figurée présente plusieurs dents en position fonctionnelle, caractérisées par une cavité pulpaire réduite et une épaisseur importante de dentine. Plusieurs bourgeons dentaires sont également visibles, tous bien développés (figure 28-K), mais la coupe ne permet pas de voir les bourgeons les plus jeunes. Les cellules de l'épithélium sont toujours visibles à certains endroits (figure 28-K'), bien que celui-ci ait considérablement été abimé lors de la coupe. Les odontoblastes sont également visibles et présentent une densité relativement faible et de long processus cytoplasmiques (figure 28-K''). La dentine est très développée sur tous les bourgeons dentaires visibles et présente les mêmes propriétés histologiques que les dents des deux genres de *Raja* figurés dans les sections précédentes. La couche d'émailloïde est à peine visible (figure 28-K''), ce qui correspond aux observations de microscopie électronique présentées dans la première partie. Il est particulièrement difficile à observer en microscopie optique et ne semble pas coloré de manière spécifique par les colorations histologiques utilisées.

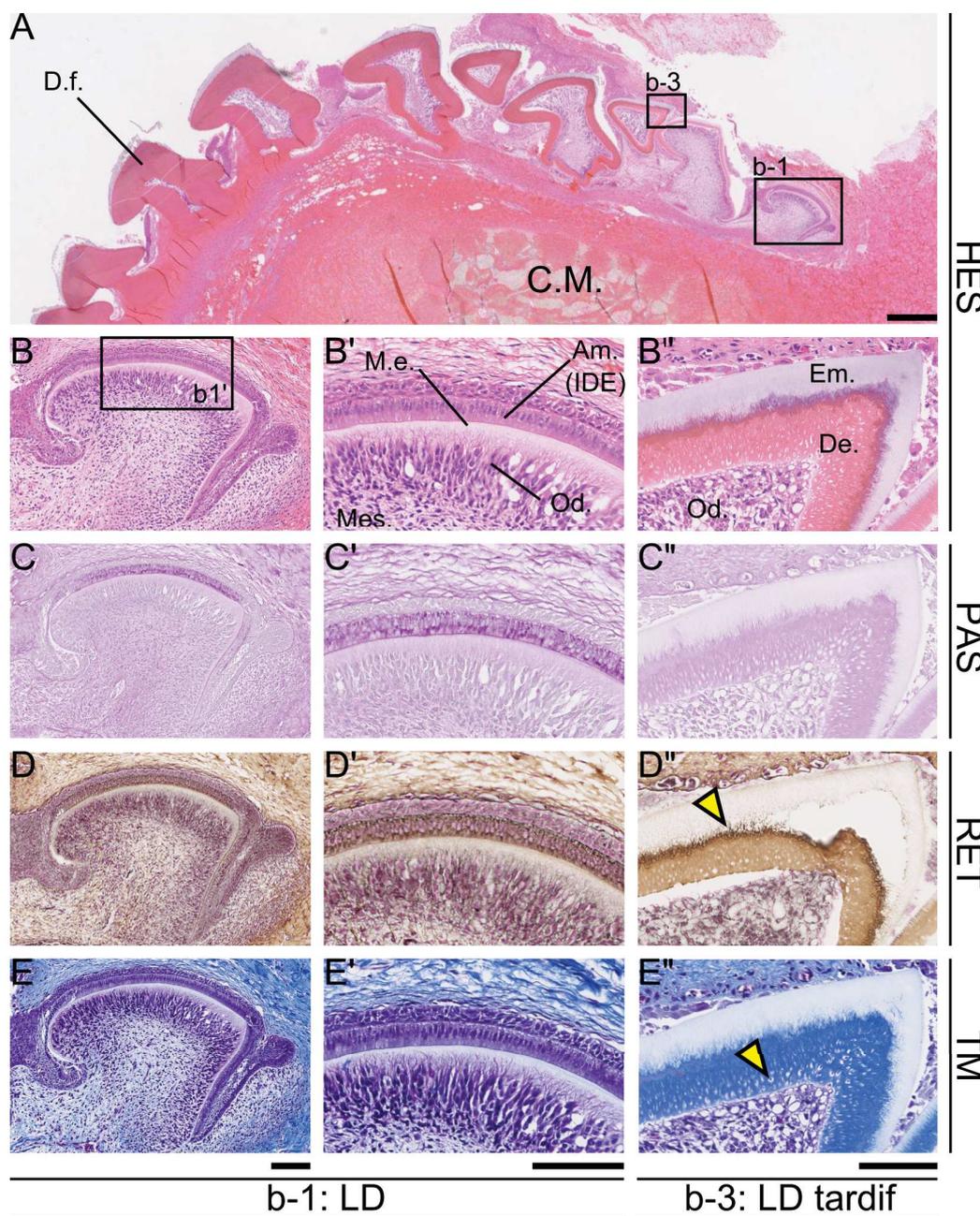


FIGURE 26. – Série dentaire de *R. asterias* (adulte, 45 cm). **A** : coupe longitudinale de la mâchoire inférieure illustrant des dents fonctionnelles, et plusieurs bourgeons dentaires. b-1 : bourgeon 1, stade LD précoce. b-3 : bourgeon 3, stade LD tardif. Marquage : HES. Échelle : 500 μ m. **B-E** : bourgeon 1 coloré au HES, PAS-BA, Réticuline et Trichrome de Masson. **B'-E'** : agrandissement de la jonction améloblastes/odontoblastes du premier bourgeon. **B''-E''** : agrandissement de la cuspidé du troisième bourgeon. Échelles : 100 μ m.

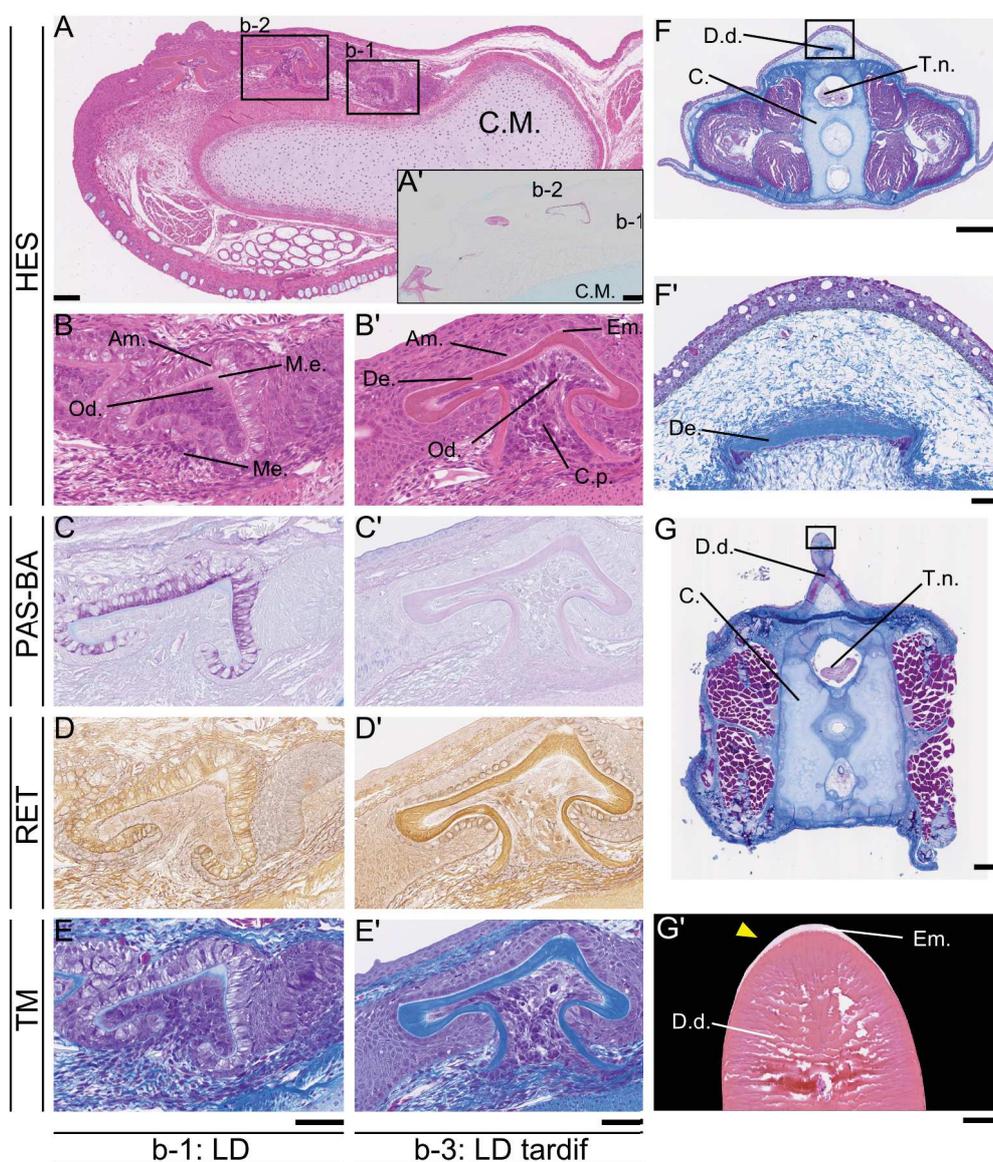


FIGURE 27. – Série dentaire et denticles dermiques de *R. clavata* (embryon, 14 cm) (A-F') et de *R. asterias* (adulte, 45 cm) (G, G'). **A** : coupe longitudinale de la mâchoire inférieure illustrant plusieurs bourgeons dentaires. b-1 : bourgeon 1, stade LD. b-3 : bourgeon 3, stade LD tardif. Marquage : HES. Échelle : 100 μ m. **A'** : coupe longitudinale de la mâchoire inférieure d'un embryon coloré au bleu alcian et rouge d'alizarine, illustrant la minéralisation précoce de la couronne. Échelle : 100 μ m. **B-E** : bourgeon 1 coloré au HES, PAS-BA, Réticuline et Trichrome de Masson. **B'-E'** : agrandissement de la cuspide du troisième bourgeon. Échelle : 50 μ m. **F** : coupe transversale dans la région caudale, illustrant la position des denticles dermiques répartis le long de l'axe antéro-postérieur (encadré). Marquage : Trichrome de Masson. Échelle : 500 μ m. **F'** : agrandissement d'un denticule dermique en développement. Marquage : Trichrome de Masson. Échelle : 50 μ m. **G** : coupe transverse dans la région caudale d'un adulte, illustrant un denticule dermique bien développé dans la région dorsale. Marquage : Trichrome de Masson. Échelle : 500 μ m. **G'** : agrandissement d'un denticule dermique fonctionnel, illustrant l'épaisseur importante de dentine surmontée par une couche très fine d'émailloïde (flèche jaune). Marquage : HES. Échelle : 100 μ m.

L'absence des bourgeons dentaires les plus jeunes ne permet pas d'en dire plus sur les matrices extra-cellulaires de ces deux tissus.

16.2. Ultrastructure

Les données obtenues en microscopie électronique à transmission sur la dentition embryonnaire de *S. canicula* et *R. clavata* sont présentées dans les figures 29 et 30. Ce type de microscopie permet d'accéder à l'ultrastructure des cellules (échelle nanométrique) et donc de pouvoir décrire le contenu de la matrice extra-cellulaire et celui des cellules environnantes.

Un seul bourgeon dentaire a été examiné dans la dentition de *S. canicula*, correspondant à un stade LD tardif (figure 29-A), ce qui signifie que la matrice de l'émailloïde est probablement déjà partiellement minéralisée (voir figure 25-A'). Une série d'observations a été réalisée le long de la couronne, depuis la base de celle-ci jusqu'à la pointe de la cuspidé (figure 29-A'). Les parties minéralisées apparaissent plus denses aux électrons que les tissus environnants (29-B, B'). Aucune fibre n'est observable, mais des structures apparemment cristallines sont visibles dans la zone minéralisée (figure 29). Les observations réalisées plus haut le long de la couronne permettent de voir des cellules bordant la zone minéralisée. Celles-ci doivent correspondre à des odontoblastes bien que leur processus n'aient pas pu être observés de manière satisfaisante (les membranes cellulaires en général s'étant avérées particulièrement difficiles à observer, ce qui est probablement dû à une mauvaise fixation des échantillons). Les observations réalisées au niveau de la cuspidé permettent de mettre en évidence les améloblastes (figure 29-D-D') dont le noyau n'est pas déporté dans la zone apicale de manière marquée, ce qui correspond aux observations réalisées en microscopie optique sur des bourgeons de stade correspondant. La membrane basale n'est pas visible.

Les observations réalisées sur la dentition embryonnaire de *R. clavata* ont en revanche permis d'accéder à plusieurs bourgeons dentaires à différents stades de développement (figure 30-A). Le bourgeon dentaire le plus jeune, au stade LD, présente déjà un dépôt de matrice extra-cellulaire entre les cellules épithéliales et mésenchymales (figure 30). L'ultrastructure de cette région du bourgeon dentaire permet de voir les améloblastes, dont le noyau est fortement déporté dans la zone apicale, et une quantité importante

16. Histologie et ultrastructure

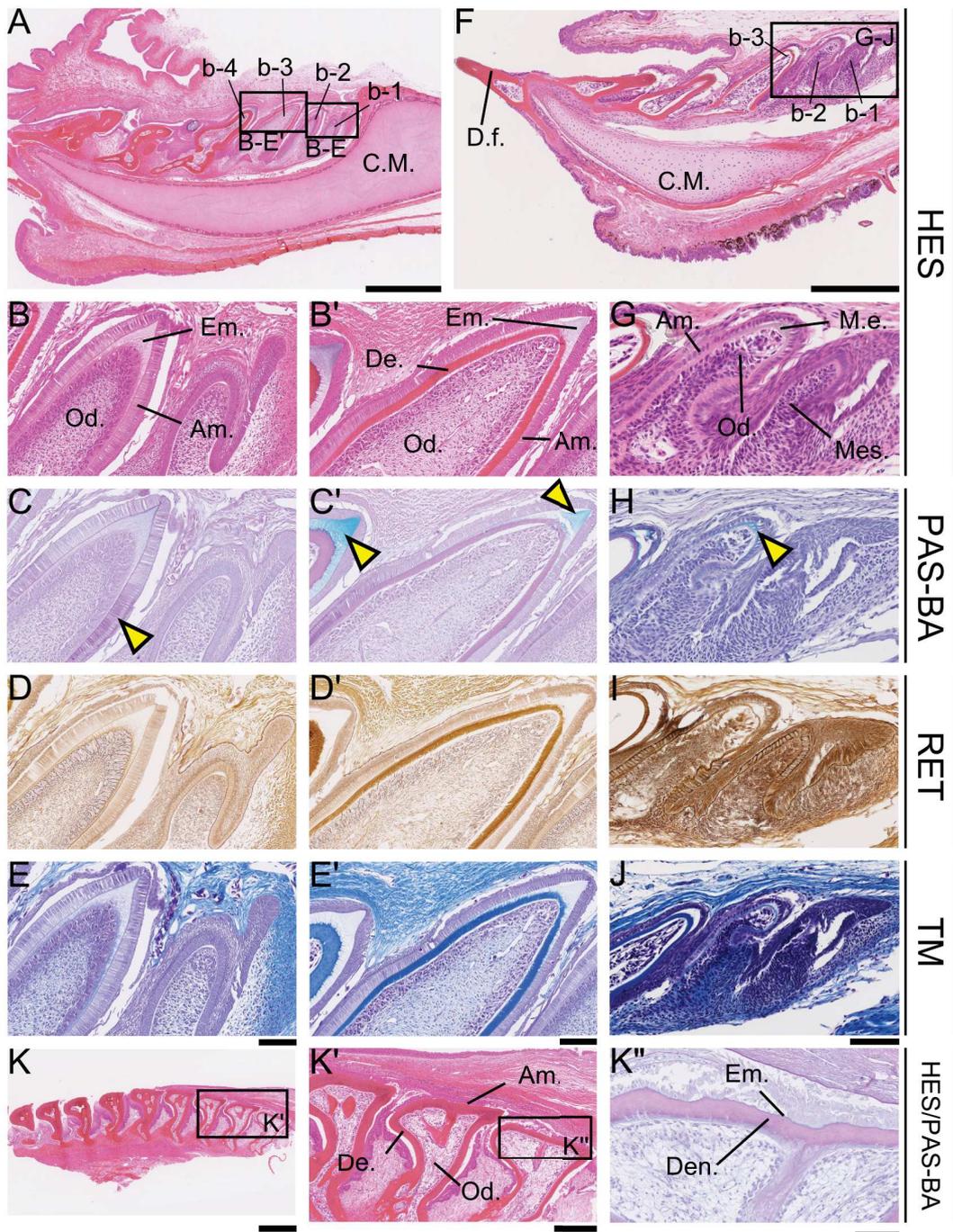


FIGURE 28. – Séries dentaires d'autres néosélaciens : *Squalus acanthias* (subadulte, 40 cm, A-E'), *Etmopterus cf. spinax* (juvénile, 14 cm, F-J), *Mobula japanica* (adulte, K-K"). **A** : coupe longitudinale de la mâchoire inférieure de *S. acanthias* illustrant plusieurs bourgeons dentaires. Marquage : HES. Échelle : 1mm. **B-E** : bourgeons 1 et 2 au stade LD précoce et tardif respectivement et colorés au HES, PAS-BA, Réticuline et Trichrome de Masson. Échelle : 100 µm. **B'-E'** : bourgeon 3 et cuspide du bourgeon 4. Échelle : 100 µm. **F** : coupe longitudinale dans la mâchoire inférieure de *E. cf. spinax* illustrant plusieurs bourgeons dentaires et une dent fonctionnelle. Marquage : HES. Échelle : 500 µm. **G-J** : bourgeons 1 et 2 et cuspide du 3^{ème} bourgeon. Échelle : 100 µm. **K** : coupe longitudinale dans la mâchoire inférieure de *M. japanica*, illustrant plusieurs bourgeons dentaires et plusieurs dents fonctionnelles. Les bourgeons les plus jeunes sont absents de la coupe. Marquage : HES. Échelle : 1 mm. **K'** : agrandissement des bourgeons dentaires les plus jeunes. Marquages : HES. Échelle : 500 µm. **K''** : agrandissement du plus jeune bourgeon dentaire présent sur la coupe, illustrant la couche d'émailloïde extrêmement fine recouvrant la dentine. Marquage : PAS-BA. Échelle : 100 µm.

16. Histologie et ultrastructure

de fibres denses aux électrons dans la matrice de l'émailloïde (figure 30-C). Des observations similaires ont été réalisées à d'autres emplacements le long de la zone apicale du bourgeon dentaire (figure 30-D). Un agrandissement d'une de ces régions permet de distinguer la membrane basale séparant la matrice de l'émailloïde des améloblastes et des fibres présentant la striation périodique caractéristique du collagène. Leur densité et leur orientation varie en fonction des zones et un nombre important d'entre elles est visible en section transversale (figure 30-E, E').

L'observation d'un bourgeon dentaire plus vieux (figure 30-F) permet de mettre en évidence la couche d'émailloïde (figure 30-G), déjà minéralisée à ce stade (voir figure 27-A'). Celle-ci est bien visible par rapport aux tissus environnants. Des zones circulaires, espacées assez régulièrement au sein de la couche d'émailloïde, apparaissent beaucoup plus denses aux électrons (figure 30-G, I, I'). De manière générale la couche d'émailloïde est également plus dense aux électrons que les autres tissus. Plus aucune fibre ne peut être distinguée dans l'émailloïde, caractérisé par une structure apparemment cristalline (figure 30-I'). Une quantité importante de fibres peut en revanche être distingués entre l'émailloïde et les odontoblastes. Cette couche fibreuse correspond à de la dentine ou de la pré-dentine (avant minéralisation) et contient de nombreuses fibres de collagène (figure 30-H, I, I', J). Les images obtenues sur ce bourgeon permettent en revanche difficilement de discuter du contenu et de la morphologie des cellules mésenchymales et épithéliales.

16.3. Discussion

D'un point de vue histologique, le développement des dents et des denticules dermiques est remarquablement similaire. Les améloblastes présentent systématiquement une morphologie cellulaire associée à une activité de sécrétion pendant le début de la période LD, au moment où la matrice de l'émailloïde commence à être synthétisée à l'interface entre l'épithélium et le mésenchyme. Cette morphologie est transitoire, et leur morphologie dans les bourgeons plus âgés pourrait correspondre à un stade de maturation. Chez les tétrapodes, la maturation correspond à la période où la trame organique de l'émail est totalement dégradée et où le tissu est complètement minéralisé, ce qui lui permet de devenir fonctionnel (Qu et al., 2015). Les cellules mésenchymales situées à proximité des matrices extra-cellulaires, de l'émailloïde ou de la dentine, présentent des proces-

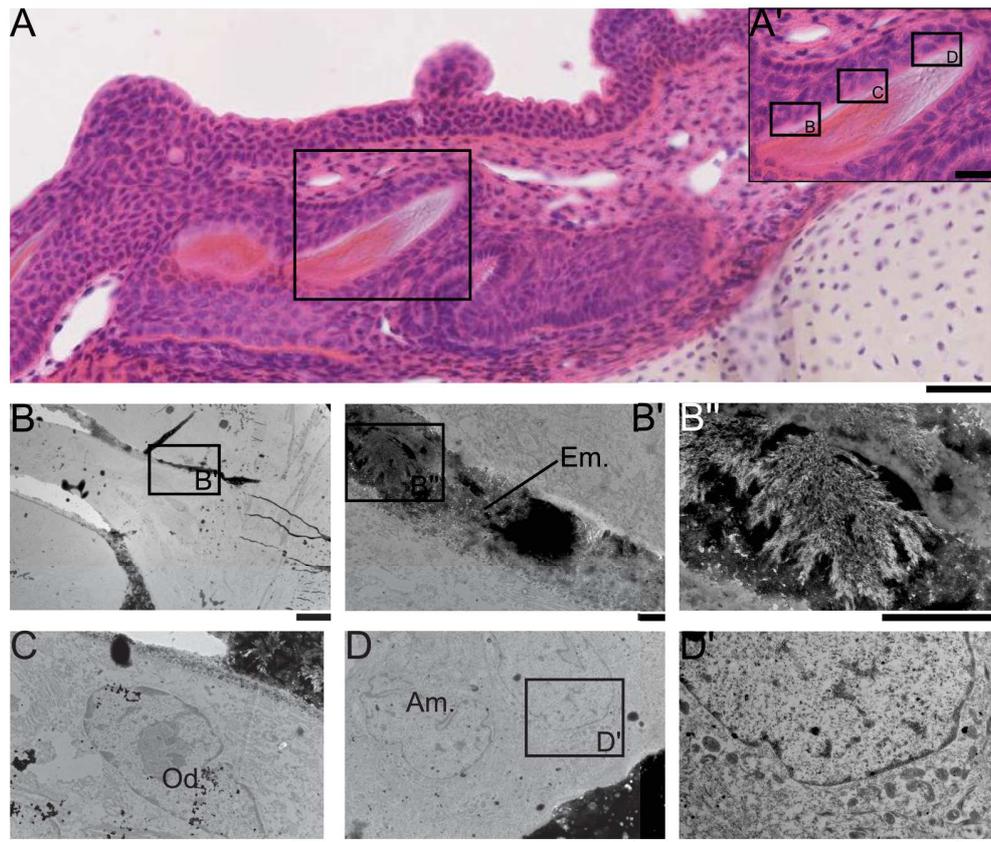


FIGURE 29. – Ultrastructure des dents en développement d'un embryon de *S. canicula*. **A** : Coupe longitudinale de la mâchoire inférieure. Marquage : HES. Échelle : 50 µm. **A'** : Encadré illustrant la position des observations réalisées sur un bourgeon dentaire. Échelle : 20 µm. **B-D'** : observations réalisées en microscopie électronique à transmission. **B** : base de la dent. Échelle : 10 µm. **B'** : agrandissement de la couche d'émaillode minéralisée (bande de couleur sombre). Échelle : 1 µm. **B''** : structure cristalline de la zone minéralisée. Échelle : 1,5µm. **C** : Odontoblaste. Échelle : 1 µm. **D** : jonction entre les améloblastes et l'émaillode minéralisé. Échelle : 2 µm. **D'** : agrandissement d'un améloblaste. Échelle : 1 µm.

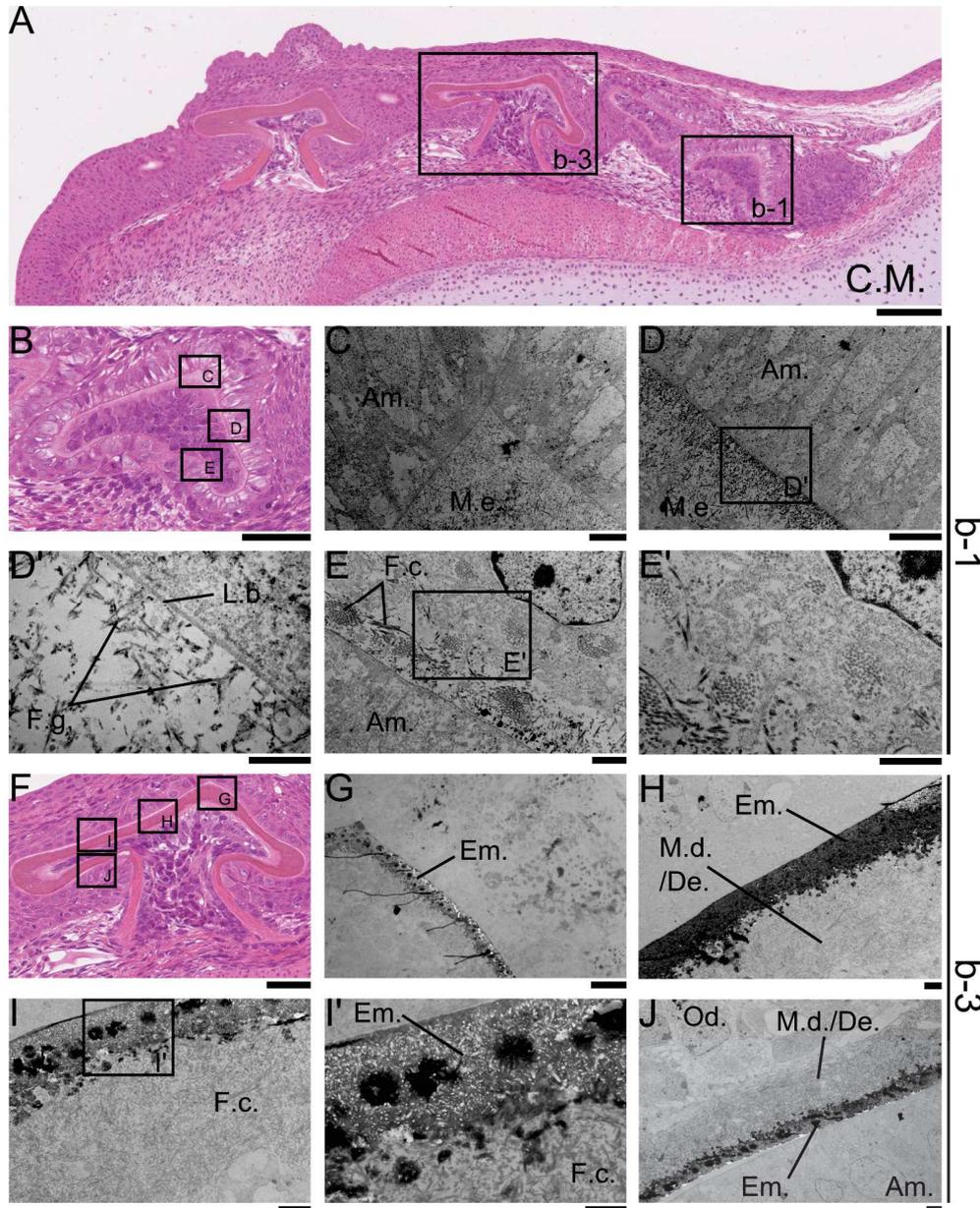


FIGURE 30. – Ultrastructure des dents en développement d'un embryon de *R. clavata*. **A** : coupe longitudinale de la mâchoire inférieure. Marquage : HES. Échelle : 100 μ m. **B-E** : bourgeon 1. **B** : vue générale du premier bourgeon dentaire illustrant la position des observations réalisées. Marquage : HES. Échelle : 50 μ m. **C** : cuspide du bourgeon. Les améloblastes sont visibles au contact de la matrice. Échelle : 5 μ m. **D** : zone de transition entre la matrice de l'émailloïde et les améloblastes : 5 μ m. **D'** : agrandissement de la zone de contact. La membrane basale est bien visible. Échelle : 1 μ m. **E** : Odontoblaste et matrice de l'émailloïde. Échelle : 1 μ m. **E'** : agrandissement de E illustrant des groupements de fibres dans la matrice de l'émailloïde. Échelle : 1 μ m. **F-J** : bourgeon 3. **F** : vue générale du troisième bourgeon dentaire illustrant la position des observations réalisées. Marquage : HES. Échelle : 50 μ m. **G** : cuspide du bourgeon. La couche d'émailloïde est bien visible. Échelle : 10 μ m. **H** : couche d'émailloïde minéralisée (bande sombre). Un réseau fibreux, correspondant à la dentine, est situé en dessous. Échelle : 2 μ m. **I** : minéralisation de la couche d'émailloïde. Échelle : 2 μ m. **I'** : agrandissement de la couche d'émailloïde et du réseau fibreux sous-jacent. Échelle : 1 μ m. **J** : transition entre les améloblastes et la couche d'émailloïde. Échelle : 2 μ m.

16. Histologie et ultrastructure

sus cytoplasmiques très développés. Les odontoblastes sont de plus toujours présents dans les stades dentaires plus tardifs, y compris dans les dents fonctionnelles, où ils tapissent l'intérieur de la cavité pulpaire quand celle-ci est présente (figures 26-A ; 28-F). La matrice de l'émailloïde est faiblement colorée par les marquages indiquant la présence de collagène dans les premiers stades où elle est visible (LD), et le tissu n'est pas coloré de manière distincte dans les stades les plus âgés. Ces données concordent avec l'ultrastructure des premiers bourgeons de *Raja clavata*, qui indique que si la matrice de l'émailloïde contient effectivement du collagène (figure 30-D'), celui-ci est présent en quantité beaucoup moins importante que dans la dentine (figure 30-I)

La matrice de l'émailloïde est calcifiée peu de temps après son dépôt initial (figure 30-E, H). La dentine est également produite très rapidement par les odontoblastes, puisqu'elle est déjà bien visible sur les bourgeons suivants. Elle est toujours fortement marquée par les colorations révélant la présence de collagène, ce qui est confirmé par les observations ultrastructurales. L'interface entre ces deux tissus est caractérisée par une zone de transition fibreuse bien marquée sur les coupes histologiques (e.g. figure 23-B''-E''). Cette zone de transition, mieux visible dans la dentition que dans les denticules dermiques (ce qui est certainement simplement dû à la finesse du tissu hyperminéralisé les recouvrants) est également bien visible en microscopie électronique à balayage (figure 31) où ces fibres présentent la même morphologie que la dentine.

Malgré les ressemblances histologiques existant entre le développement de la dentition et des denticules dermiques chez ces différents taxons, quelques particularités sont toutefois notables. Le marquage RET permet de mettre en évidence la présence de collagène III (en noir) au niveau des processus des odontoblastes de la plupart des bourgeons au stade LD, lorsque le dépôt initial de matrice de l'émailloïde est visible. Il ne semble en tout cas pas marquer les cellules de l'épithélium, sauf dans le cas du premier bourgeon dentaire de *R. asterias* (figure 26-D, D') chez qui les cellules sont fortement marquées. L'absence de marquage similaire dans les autres stades et espèces suggère la présence très transitoire de ce type de collagène dans les cellules de l'épithélium.

De manière plus surprenante, les améloblastes présentent également un marquage PAS beaucoup plus marqué chez les batoïdes que chez les requins examinés. Ce marquage, permettant de mettre en évidence des glycosaminoglycanes neutres et les résidus glucidiques des protéines glycosylées, est très visible dans les premiers bourgeons dentaires

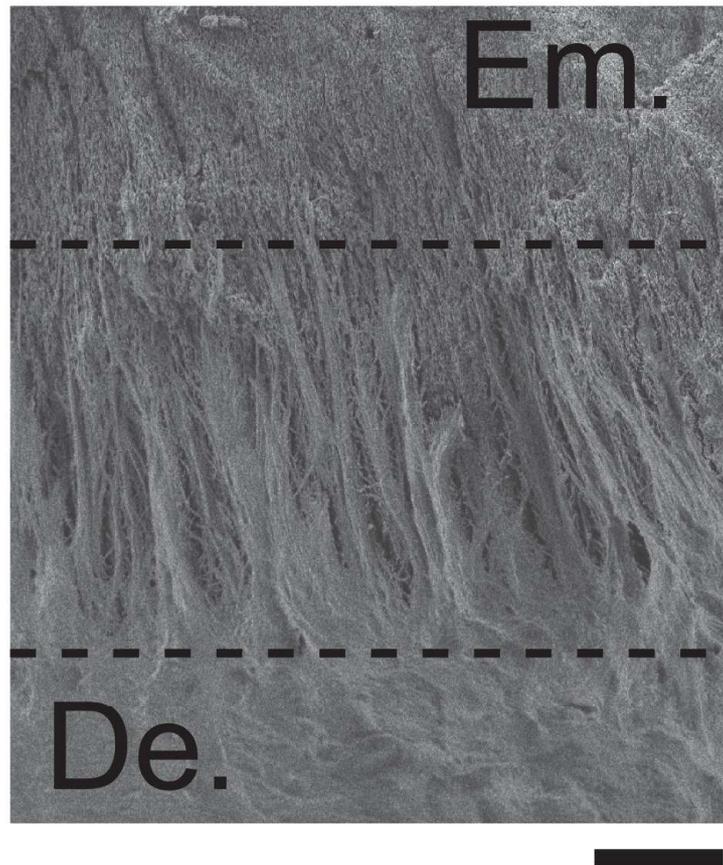


FIGURE 31. – Transition fibreuse entre la dentine et l'émailloïde dans une dent fonctionnelle de *Dasyatis margarita*. Échelle : 10 μm .

16. Histologie et ultrastructure

des deux espèces de *Raja* (figures 26-C, C' et 27-C) alors qu'il est peu présent chez *Squalus* (figure 28-C) et absent chez *Etmopterus* et *Scyliorhinus*. Aucun bourgeon plus tardif ne présente ce marquage dans l'épithélium chez l'ensemble des espèces examinées. Il n'est pas non plus visible dans l'épithélium des denticules dermiques de *Scyliorhinus*. La présence importante de glycosaminoglycanes dans les cellules de l'épithélium a été soulignée par plusieurs auteurs chez plusieurs espèces de chondrichthyens (Everett & Miller, 1981; Goto, 1978; Kerr, 1955; Nanci et al., 1983; Shellis, 1978; Probst & Skobe, 1988a). Ces travaux ne sont toutefois pas en accord sur la question de la sécrétion éventuelle de ces molécules dans la matrice de l'émailloïde (Goto, 1978; Probst & Skobe, 1988a; Sasagawa & Akai, 1992). Les résultats obtenus dans ce travail suggèrent que ces molécules ne sont pas sécrétées dans la matrice de l'émailloïde : en effet, le dépôt initial de matrice de l'émailloïde n'est jamais marqué par le PAS-BA quels que soient les espèces ou les stades développementaux considérés. Ces résultats suggèrent que la sécrétion de glycosaminoglycanes ou de protéines glycosylées observée dans les cellules épithéliales contribue à la formation de la membrane basale, ce qui est également en accord avec des données obtenues chez d'autres taxons (Sasagawa & Akai, 1992). Si ces molécules ne sont donc probablement pas sécrétées dans la matrice de l'émailloïde, il est en revanche inattendu que ce marquage soit faible (*Squalus*), voire absent (*Scyliorhinus*, *Etmopterus*) chez les sélachimorphes examinés ici. Ce résultat implique que la membrane basale, zone d'interaction précoce entre améloblastes et odontoblastes, est de nature différente chez les sélachimorphes et les batoïdes.

A l'inverse, le marquage bleu-turquoise caractéristique du bleu alcian, couplé au PAS, est visible dans la matrice de l'émailloïde de certains sélachimorphes, mais pas dans celle des batoïdes. Le marquage est particulièrement visible dans la cuspidé des bourgeons dentaires de *Squalus* (figure 28-C', flèches jaunes). Il est plus diffus dans les premiers bourgeons d'*Etmopterus* (figure 28-H, flèche jaune) et chez l'embryon de *Scyliorhinus* (figure 25-C, flèche rouge). Ce marquage n'est en revanche visible ni chez les spécimens plus âgés de *Scyliorhinus*, ni dans les denticules dermiques de ce dernier, et n'a pu être mis en évidence chez aucune des raies examinées, bien que le marquage PAS réalisé chez *R. asterias* ne soit pas couplé à du bleu alcian. Celui-ci permet notamment de mettre en évidence les glycosaminoglycanes acides, et suggère qu'il en existe une quantité plus importante dans la matrice de l'émailloïde des requins que dans celle des batoïdes.

16. Histologie et ultrastructure

La plupart des travaux basés sur des observations de microscopie électronique à transmission décrivent la présence de « fibres géantes » dans la matrice de l'émailloïde, considérées comme une forme de collagène modifié (Kemp, 1985; Proatak & Skobe, 1988a; Proatak et al., 1990; Sasagawa, 1988). Celles-ci sont caractérisées par une striation périodique de 17,5 nm tandis que les fibres de collagène ont une striation périodique d'environ 40-60 nm (Proatak & Skobe, 1988a; Sasagawa, 1989). Leur origine est également problématique et elles ont été alternativement considérées comme étant d'origine ectodermique (Kemp, 1985) ou bien produites par les odontoblastes (Proatak & Skobe, 1988a; Proatak et al., 1990; Sasagawa, 1988). Chez *Raja clavata*, les deux types de fibres sont détectés dans la matrice de l'émailloïde : quelques « fibres géantes », présentant une striation périodique d'environ 17 nm (figure 30-D') et des fibres de collagènes classiques (figure 30-E, E'). Il est difficile de statuer sur leur origine en se basant uniquement sur les résultats d'observations en microscopie électronique présentés ici, mais considérant la présence d'une membrane basale importante entre la matrice de l'émailloïde et les améloblastes, il est plus probable qu'elles soient issues de l'activité des odontoblastes, ce qui est généralement admis sur la base d'autres observations similaires (Proatak & Skobe, 1988a; Sasagawa, 1988). La périodicité des fibres présentes dans la matrice de la dentine est cohérente avec du collagène classique (figure 30-H, I, I'). Aucune trace des vésicules tubulaires décrites dans la matrice de l'émailloïde n'est visible ici (Sasagawa, 1989; Sasagawa & Akai, 1992), ce qui peut être imputable à la préparation des échantillons, peu optimale pour visualiser les membranes.

Les données de microscopie électronique présentées dans ce chapitre, encore limitées et restreintes à *R. clavata* (des bourgeons jeunes de *Scyliorhinus* n'ayant pas pu être observés), sont également difficiles à corrélérer avec les microstructures présentées dans la partie précédente, mais ne sont pas en contradiction avec ces dernières. Plusieurs observations ultrastructurales dans la littérature illustrent bien le fait que si les cristallites des sélachimorphes et des rajiformes semblent assez étroitement associées avec les fibres (collagènes ou « fibres géantes ») de la matrice de l'émailloïde (Kerebel et al., 1977; Proatak et al., 1990; Sasagawa, 1989), ce n'est en revanche pas le cas chez les myliobatiformes (Sasagawa, 2002a), ce qui correspond très clairement aux observations réalisées sur la microstructure dentaire de ces groupes.

L'ensemble de ces résultats permet de dégager les points suivants : i) une faible quan-

16. Histologie et ultrastructure

tité de collagène est présente dans la matrice de l'émailloïde, probablement secrétée par les odontoblastes (bien que la présence apparente de collagène de type III dans les cellules épithéliales de *R. asterias* reste à clarifier), des « fibres géantes », sont également présentes, des résultats qui suggèrent que l'émailloïde ne peut pas être considéré uniquement comme une forme de dentine hyperminéralisée. Au contraire, la dentine apparaît très riche en collagène. ii) l'activité des améloblastes reste encore à définir avec précision, et sur la base de ces données il n'est pas établi qu'ils contribuent à la synthèse de la matrice de l'émailloïde, ce qui n'exclut pas une activité plus tardive, et notamment une implication dans la minéralisation de la matrice de l'émailloïde; iii) Celle-ci est formée et au moins partiellement minéralisée avant la formation de la dentine, ce qui concorde avec les données existant dans la littérature. v) la zone de transition entre les deux tissus n'est pas clairement définie et de nombreuses fibres, incluant du collagène de type III d'après nos colorations, s'étendent dans la couche d'émailloïde, y compris au sein de dents minéralisées et fonctionnelles.

Enfin, les différences mises en évidence par le marquage PAS-BA, distinctes chez les sélachimorphes et chez les batoïdes, offrent quelques pistes à explorer concernant leurs significations éventuelles pour expliquer les différences morphologiques importantes existant entre la microstructure de l'émailloïde des deux groupes.

17. Approche moléculaire : odontogénèse et biominéralisation

Étant donnée la singularité du renouvellement dentaire des néosélaciens, il n'est pas surprenant qu'il soit à l'origine de nombreux travaux consacrés à ses caractéristiques morphologiques. Ses caractéristiques moléculaires sont toutefois moins connues. Il est possible de regrouper ces dernières en deux thématiques majeures : i) la mise en place des tissus dentaires, qu'il s'agisse de la dentine ou de l'émailloïde. Ce point regroupe les deux aspects discutés dans le chapitre précédent, à savoir l'origine cellulaire des matrices et leur composition (fibres protéiques et glycosaminoglycanes) et ii) les mécanismes moléculaires de biominéralisation, qui permettent de transformer ces matrices en tissus fonctionnels en les minéralisant de manière parfois très importante.

La capacité de minéraliser des tissus est en effet une fonction cruciale chez les vertébrés dans la mesure où son acquisition a conditionné l'évolution et la diversification du système squelettique. Elle est donc tout aussi importante que l'apparition des mâchoires ou de la dentition chez les gnathostomes puisque c'est une condition préalable à l'apparition de ces structures. Les processus de biominéralisation sont généralement liés à l'apport et à la régulation de la concentration d'ions métalliques dans la matrice extra-cellulaire. Chez les vertébrés, c'est la calcification qui est le processus de minéralisation le plus répandu (Francillon-Vieillot et al., 1990; Kawasaki et al., 2004). L'étude du contrôle génétique de la biominéralisation a notamment permis la mise en évidence d'un certain nombre de gènes cruciaux dans l'évolution des structures minéralisées chez les vertébrés, en particulier les SCCP (*Secretory Calcium-binding Phosphoprotein*), une famille de gènes impliquée dans la régulation du calcium dans le milieu extra-cellulaire (Kawasaki & Weiss, 2003). Les SCPPs sont issus de plusieurs séries de duplications géniques, les reliant aux gènes *SPARC* et *SPARC-like*, deux gènes également impliqués dans la

17. Approche moléculaire : odontogénèse et biominéralisation

régulation du calcium (Bertrand et al., 2013; Kawasaki et al., 2007). Les duplications de gènes sont connues pour être à l'origine de « nouveautés évolutives », permises par la néo-fonctionnalisation des nouvelles copies du gène en question, qui ne sont plus soumises à des pressions de sélection aussi importantes (Ohno, 1970; Kawasaki & Weiss, 2003; Kawasaki et al., 2007). La famille SCPP regroupe également les gènes codant pour les EMP (*Enamel Matrix Proteins*) chez les sarcoptérygiens, notamment l'amélogénine, l'énaméline et l'améloblastine, qui sont sécrétées dans la matrice de l'émail par les améloblastes. Celles-ci sont ensuite dégradées au cours du processus de maturation, pendant lequel les cristaux d'hydroxyapatite cristallisent dans la matrice (Moradian-Oldak, 2012; Sire et al., 2007). Pendant la phase de maturation, les améloblastes sécrètent des protéines comme l'amélotine ou ODAM (*Odontogenic ameloblast associated*), qui sont impliquées dans le processus de minéralisation (Kawasaki & Weiss, 2008).

Les SCPPs n'ont toutefois pas pu être mises en évidence dans le génome de la chimère éléphant *Callorhinchus milii*, ce qui laisse supposer que les chondrichthyens dans leur ensemble en sont dépourvus. En revanche *SPARC* et *SPARC-Like* sont bien présents dans son génome, et Venkatesh et al. (2014) en concluent que l'apparition de la famille SCPP s'est produite après la divergence entre les chondrichthyens et les ostéichthyens. L'absence des SCPPs dans le génome de *Callorhinchus* est toutefois interprétée par Ryll et al. (2014) comme une perte secondaire chez les chondrichthyens, expliquant l'absence d'ossification périchondrale chez les membres dérivés du groupe. L'absence probable des SCPPs du génome des chondrichthyens constitue en tout cas un argument fort contre l'homologie de l'émailloïde et de l'émail.

La présence de certaines EMP, en particulier l'énaméline et la tuftéline a pourtant été documentée dans la matrice de l'émailloïde des chondrichthyens (Herold et al., 1980; Satchell et al., 2002). Ces résultats se basent sur des techniques d'immunohistologie utilisant des anticorps mammaliens, ce qui soulève la question des faux positifs liés à l'absence d'anticorps spécifiques aux chondrichthyens. Bien entendu, nous avons également cherché les gènes codant pour les EMP dans les banques d'ADNc à notre disposition (chez *S. canicula* et *R. clavata*), sans résultat. Afin de tenter d'amener des éléments nouveaux au processus de minéralisation des tissus dentaires, ainsi que de répondre aux questions laissées en suspens dans la partie précédente, les patrons d'expression de plusieurs gènes d'intérêt y ont été examinés. Cette approche, permise par la technique de l'hybridation

17. Approche moléculaire : odontogénèse et biominéralisation

in situ, permet de détecter la présence d'ARNm spécifiques dans les cellules suite à la synthèse d'une sonde complémentaire aux ARNm ciblés.

Trois familles de gènes ont donc été considérées ici. Les collagènes dans un premier temps, qui constituent les protéines structurales les plus importantes des matrices extracellulaires des vertébrés, puisqu'elles permettent non seulement la nucléation des cristaux d'hydroxyapatite au cours du processus de minéralisation, mais peuvent également conditionner leur orientation au sein de la matrice. Ces caractéristiques font de ces gènes les candidats idéaux pour tenter de comprendre la mise en place de la microstructure dentaire (Hall, 2005; Landis & Silver, 2009), malgré la densité moins importante de fibres dans la matrice de l'émailloïde comparé à celle de la dentine. L'approche par hybridation *in situ* devrait notamment permettre de définir si le collagène présent dans la matrice de l'émailloïde peut être d'origine ectodermique. Ils constituent une famille de gènes nombreuse, et c'est principalement les collagènes fibrillaires qui présentent un intérêt dans le contexte présent (Exposito et al., 2010). L'examen de la banque de séquences d'ADNc à notre disposition a permis de mettre en évidence des collagènes de type I, notamment impliqués dans des processus d'ossification, et des collagènes de type II et XI, plutôt caractéristiques des tissus cartilagineux (Eames et al., 2012; Estêvão et al., 2011). Dans les tissus dentaires ils sont généralement exprimés par les odontoblastes (chez la souris par exemple) mais également et plus rarement par les cellules épithéliales, ce qui a été documenté chez un amphibien (Assaraf-Weill et al., 2014) et des téléostéens (Huysseune et al., 2008; Kawasaki et al., 2005; Kawasaki, 2009a).

Considérant la récurrence de l'hypothèse de présence de kératines dans la matrice de l'émailloïde, des gènes codants pour des kératines de type I et II ont été isolés afin de pouvoir en examiner les patrons d'expression. Ces observations, peu concluantes dans la mesure où la plupart d'entre elles ne montrent aucune expression dans les tissus dentaires, sont toutefois encore très préliminaires. Deux exemples, présentant des patrons d'expression très différents, sont présentés ici.

Enfin, les gènes *SPARC* et *SPARC-Like* ont également pu être isolés dans la banque d'ADNc, et compte tenu de leur rôle crucial dans les processus de calcification chez les gnathostomes, leur patron d'expression dans les tissus dentaires a été examiné pour tenter de préciser les modalités de minéralisation de la matrice de l'émailloïde. Les données d'expression de ces gènes dans les bourgeons dentaires et dans les bourgeons des

denticules dermiques sont présentées dans les paragraphes suivants.

17.1. Collagènes

La figure 32 présente les patrons d'expression des collagènes de type I et de type II dans les bourgeons dentaires et les bougeons de denticules dermiques de *S. canicula*. Les collagènes de type I présentent des patrons d'expression très similaires. Ils sont tous les deux exprimés dans le mésenchyme des dents au stade LD, et leur expression se prolonge tard dans l'odontogénèse puisque *Col1a1* est encore transcrit dans une dent qui semble déjà fonctionnelle ou qui est sur le point de le devenir (figure 32-A). Ces gènes ne sont en revanche pas transcrits dans l'épithélium. Les coupes réalisées dans les mâchoires ne permettent pas de discuter de l'expression de ces gènes dans des bourgeons plus jeunes. Toutefois, des bourgeons de denticules dermiques au stade ED sont visibles sur les coupes transversales de la région troncale (figure 32-B, E, F). Aucun des deux collagènes de type I n'est transcrit à ce stade, que ce soit dans le mésenchyme ou dans l'épithélium. Leurs patrons d'expression au sein de denticules dermiques plus âgés (figure 32-C, F) correspondent à leur expression dans les dents, et ils sont uniquement exprimés dans le mésenchyme où les odontoblastes doivent avoir une activité sécrétrice. *Col2a1* présente des patrons d'expression similaires, bien que le signal d'expression soit plus faible dans le mésenchyme dans les bourgeons de stade LD. Aucune expression n'est détectée dans le bourgeon au stade LD précoce (figure 32-G), ce qui suggère que le gène est transcrit relativement tardivement au cours du développement dentaire. Aucune trace d'expression dans l'épithélium n'est visible (figure 32-G, G', H, I).

Aucune expression de *Col11a1* n'est détectée dans les dents (figure 33-A, A'). Il n'est pas transcrit non plus dans les bourgeons de denticules dermiques au stade ED, mais il est faiblement exprimé dans les bourgeons de denticules dermiques de stade LD (figure 33-B, C). Comme les autres collagènes examinés, *Col11a2* est transcrit exclusivement dans le mésenchyme, où les premières traces d'expression sont détectables chez un bourgeon au stade LD précoce (figure 33-D, D') toutefois assez abimé par la coupe. Dans les bourgeons des denticules dermiques, aucune expression du gène n'est visible au stade ED, mais il est transcrit dans le mésenchyme du bourgeon au stade LD (33-E, F), ce qui correspond aux patrons d'expression des autres collagènes figurés.

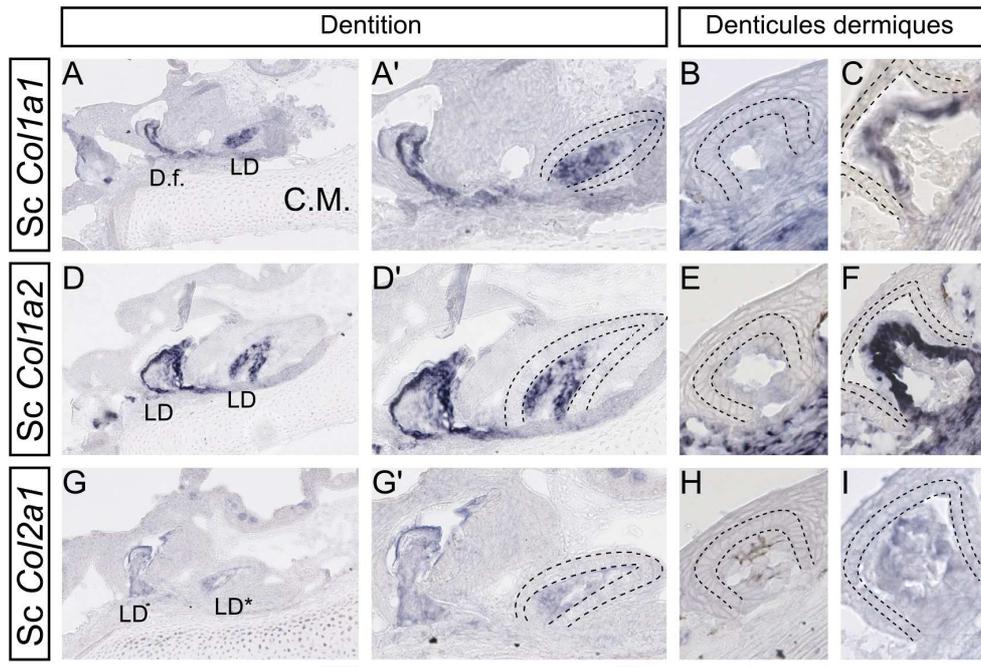


FIGURE 32. – Expression des gènes codant pour les collagènes de type I et II dans les bourgeons dentaires d'un embryon de *S.canicula* de 9 cm. **A, D, G** : coupes longitudinales dans la mâchoire inférieure. Le stade des bourgeons dentaires, directement indiqué sur la figure (* : stade précoce) est variable en fonction des coupes.. Les gènes ciblés sont indiqués dans la colonne de gauche. Échelle : 100 μ m. **A', D', G'** : agrandissement sur les bourgeons dentaires. L'épithélium dentaire (améloblastes) est indiqué par des lignes pointillées. Échelle : 100 μ m. **B, E, H** : bourgeons de denticules dermiques au stade ED, avant synthèse de la matrice extra-cellulaire. Échelle : 50 μ m. **B', E', H'** : bourgeons de denticules dermiques au stade LD. Échelle : 50 μ m.

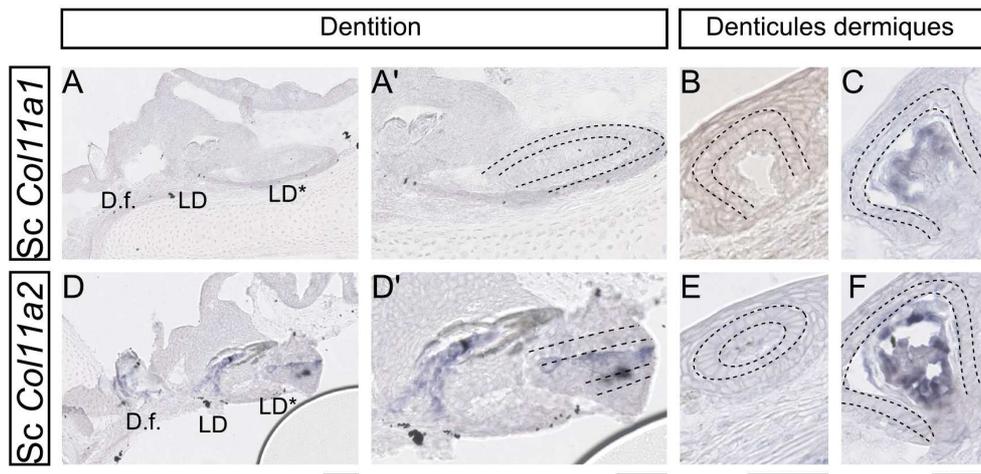


FIGURE 33. – Expression des Collagènes de type XI dans les bourgeons dentaires d'un embryon de *S.canicula* de 9 cm. **A, D** : coupes longitudinales dans la mâchoire inférieure. Sur la plupart des coupes plusieurs bourgeons dentaires sont visibles ainsi que des dents fonctionnelles. Les gènes ciblés sont indiqués dans la colonne de gauche. Échelle : 100 μ m. **A', D'** : agrandissement sur les bourgeons dentaires. Échelle : 100 μ m. **B, E** : bourgeons de denticules dermiques au stade ED, avant synthèse de la matrice extra-cellulaire. Échelle : 50 μ m. **C, F** : bourgeons de denticules dermiques au stade LD. Échelle : 50 μ m.

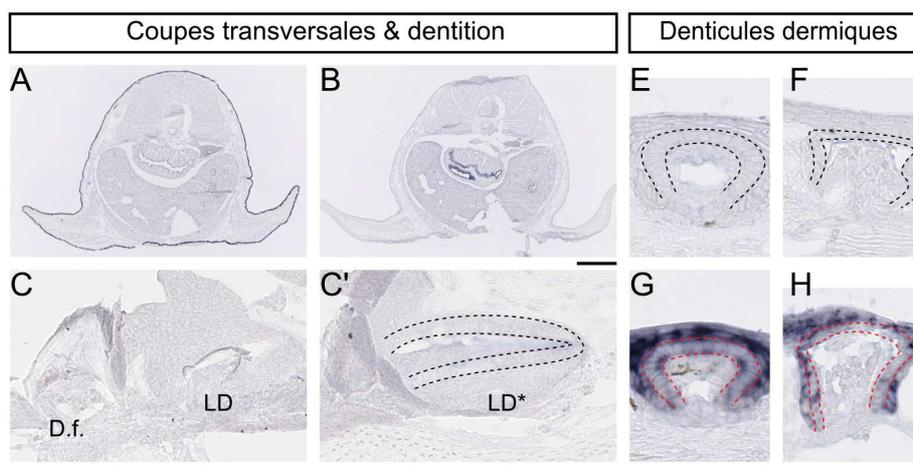


FIGURE 34. – Expression des kératines de type I et II dans les bourgeons dentaires d'un embryon de *S. canicula* de 9 cm. **A** : coupe transversale dans la région troncale, patron d'expression d'une kératine de type II. **B** : coupe transversale dans la région troncale, patron d'expression d'une kératine de type I. Échelle : 1 mm. **C** : coupe longitudinale de la mâchoire inférieure avec une dent fonctionnelle et un bourgeon dentaire au stade LD tardif. **C'** : bourgeon dentaire au stade LD précoce. **C, C'** : kératine de type I. **E, G** : bourgeons de denticules dermiques au stade ED, avant synthèse de la matrice extracellulaire. Échelle : 50 µm. **F, H** : bourgeons de denticules dermiques au stade LD. Échelle : 50 µm. **E, F** : Kératine de type I. **G, H** : Kératine de type II.

17.2. Kératines

Les patrons d'expression de deux kératines ont également été examinés et sont présentés dans la figure 34. La kératine de type II est fortement exprimée dans l'épiderme (figure 34-A). Son expression n'a pas pu être vérifiée dans la dentition mais elle est transcrite dans l'épithélium des bourgeons dentaires de stade ED, quoique plus faiblement que dans les cellules de l'épiderme situées au dessus (figure 34-G). Elle est toujours faiblement transcrite dans l'épithélium des bourgeons dentaires de stade LD (figure 34-H). La kératine de type I est exprimée dans la muqueuse du tractus digestif (figure 34-B), et elle ne semble transcrite ni dans les bourgeons dentaires (figure 34-C, C'), ni dans les bourgeons des denticules dermiques (figure 34-E, F).

17.3. SPARC_s

La figure 35 présente les patrons d'expression des gènes *SPARC* et *SPARC-Like* dans les bourgeons dentaires et ceux des denticules dermiques. *SPARC* est fortement exprimé dans le mésenchyme des bourgeons dentaires au stade LD, et sa transcription se poursuit dans le mésenchyme emplissant la cavité pulpaire de la dent fonctionnelle (figure

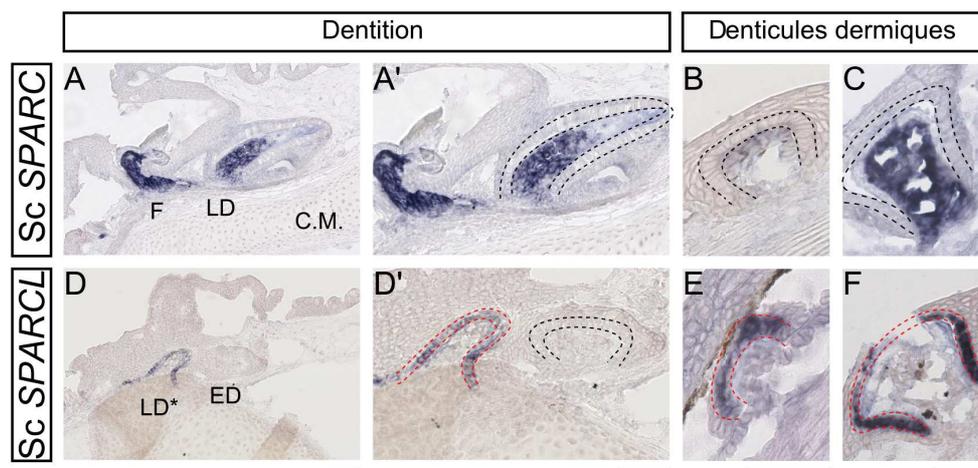


FIGURE 35. – Expression de *SPARC* et *SPARC-Like* dans les bourgeons dentaires d'un embryon de *S. canicula* de 9 cm. **A, D**, : coupes longitudinales dans la mâchoire inférieure. Deux bourgeons dentaires sont visibles. Les gènes ciblés sont indiqués dans la colonne de gauche. Échelle : 100 μ m. **A', D'** : agrandissement sur les bourgeons dentaires. Échelle : 100 μ m. **B, E** : bourgeons de denticules dermiques au stade ED, avant synthèse de la matrice extra-cellulaire. Échelle : 50 μ m. **C, F** : bourgeons de denticules dermiques au stade LD. Échelle : 50 μ m.

35-A, A'). Dans les bourgeons des denticules dermiques, il est faiblement exprimé dans le mésenchyme au stade ED, puis plus fortement au stade LD (figure 35-B, C) ce qui correspond à son patron d'expression dans les bourgeons dentaires. *SPARC* n'est pas transcrit dans l'épithélium des stades développementaux visibles. Outre son expression précoce dans le mésenchyme du stade ED des denticules dermiques (les données d'expression au stade correspondant dans la dentition n'ont pas pu être vérifiées) ses patrons d'expression sont très similaires à ceux des collagènes (figure 32 et 33).

Le patron d'expression de *SPARC-Like* est en revanche complètement différent, puisqu'il est transcrit dans l'épithélium mais pas dans le mésenchyme (figure 35-D, D', E, F). Dans la dentition, il est transcrit à un stade LD précoce, mais pas dans le bourgeon de stade ED présent sur la coupe (figure 35-D'). Celle-ci ne permet pas de vérifier son expression dans les stades plus tardifs. Dans les bourgeons des denticules dermiques il est clairement transcrit dans les bourgeons de stade ED et dans les bourgeons de stade LD (figure 35-E, F), ce qui laisse supposer que son expression continue dans les stades plus tardifs des bourgeons dentaires également.

18. Discussion

L'expression de collagène par les odontoblastes des bourgeons dentaires et des denticules dermiques est confirmée, et correspond aux données obtenues chez les mammifères, chez qui le collagène de type I est le principal constituant de la dentine (Linde & Goldberg, 1993). Le signal d'expression des collagènes de type I varie en fonction du stade des bourgeons dentaires chez la souris, et son expression se poursuit dans les odontoblastes des dents complètement formées (Andujar et al., 1991; Lunkinmaa et al., 1993), ce qui correspond aux données obtenues chez la roussette. Dans l'ensemble, si les patrons d'expression des collagènes examinés sont variables en termes d'intensité de signal, tous ont tendance à présenter une expression relativement tardive dans les bourgeons dentaires et dans ceux des denticules dermiques, puisqu'ils ne sont généralement pas détectables avant des stades LD où de la matrice est déjà bien visible. Cette expression tardive indique qu'ils sont principalement impliqués dans la synthèse de la dentine. L'absence d'expression précoce dans les bourgeons laisse donc supposer qu'ils ne constituent pas une part majeure de la matrice de l'émailloïde, ce qui concorde non seulement avec les marquages histologiques, très diffus dans ladite matrice, mais également avec le peu de fibres de collagène visibles en microscopie électronique (figure 30). Les résultats d'expression indiquent que ces collagènes sont synthétisés par les odontoblastes, qui sont également très probablement responsables de la sécrétion des « fibres géantes » si celles-ci sont effectivement une forme de collagène modifié.

Les améloblastes sont toutefois certainement impliqués dans la synthèse de la matrice de l'émailloïde chez des téléostéens (Huyseune et al., 2008; Kawasaki et al., 2005; Kawasaki, 2009a) et chez un urodèle (Assaraf-Weill et al., 2014). Chez ces taxons, du collagène de type I est exprimé à la fois par les améloblastes et par les odontoblastes pendant la synthèse de la matrice de l'émailloïde, ce qui suggère fortement que les deux types cellulaires y contribuent. Leur expression dans les odontoblastes continue dans les stades

18. Discussion

dentaires plus âgés tandis qu'elle est réduite, puis absente dans les améloblastes pendant la période de maturation. L'expression de collagène par les odontoblastes chez ces taxons est donc cohérente avec les données d'expression chez *Scyliorhinus*. La co-expression de collagène I dans les améloblastes et dans les odontoblastes de groupes possédant de l'émailloïde suggérait initialement que sa production par les améloblastes soit requise au cours de la formation du tissu (Assaraf-Weill et al., 2014). Cette hypothèse n'est donc pas soutenue par les données d'expression du collagène de type I chez *Scyliorhinus*, chez qui aucun des autres collagènes examinés n'est d'ailleurs exprimé par les améloblastes. L'examen des patrons d'expressions de ces gènes chez d'autres chondrichthyens permettra sans doute de confirmer cette observation.

Avec les collagènes, les SPARCs constituent une autre famille de gènes étroitement liée à la formation et à l'évolution des structures squelettiques (Bertrand et al., 2013). Ces gènes sont non seulement impliqués dans la régulation du calcium dans les matrices extra-cellulaires, indispensable aux processus de calcification, mais les protéines de cette famille agissent également comme chaperons pour les protéines de collagène (Martinek et al., 2007; Termine et al., 1981). Les patrons d'expression de *SPARC* ont été examinés chez le poisson-zèbre et chez le fugu, où il est co-exprimé dans les améloblastes et dans les odontoblastes pendant la synthèse des matrices de l'émailloïde et de la dentine, indiquant une contribution probable aux deux tissus (Kawasaki et al., 2005; Kawasaki, 2009b). Chez *Scyliorhinus*, *SPARC* n'est en revanche exprimé que dans les odontoblastes, ce qui correspond aux données d'expression connues chez l'homme (Mundlos et al., 1992). Si les données d'expression de *SPARC-Like* ne sont pas disponibles, les patrons d'expression du collagène de type I et de *SPARC* sont en tout cas comparables chez *Scyliorhinus* et chez les mammifères.

On peut donc émettre l'hypothèse que le terme d'émailloïde, qui comme vu auparavant demeure relativement imprécis, recouvre en fait une diversité de tissus distincts qui ne sont pas nécessairement homologues. Ce tissu est considéré comme un produit homologue au sein des chondrichthyens et des actinoptérygiens (e.g. Gillis & Donoghue, 2007) mais des différences existent pourtant dans la composition de leur matrice (beaucoup plus riche en collagène chez les actinoptérygiens (Huyseune & Sire, 1998; Probst & Skobe, 1985, 1986; Sasagawa, 1993), et dans leurs patrons de minéralisation (Risnes, 1990; Sasagawa, 1998, 2002b). L'expression de collagène par les améloblastes au cours du

18. Discussion

développement dentaire de plusieurs ostéichthyens possédant de l'émailloïde pourrait alors indiquer que celui-ci est effectivement analogue, mais pas homologue, à l'émailloïde des chondrichthyens.

Les données d'expression obtenues pour les kératines, bien que très préliminaires, indiquent également une diversité importante dans les patrons d'expression de ces gènes. Bien que les kératines de type I et de type II soient toutes les deux exprimées dans les cellules épithéliales des tétrapodes où elles contribuent notamment à la formation et au maintien du cytosquelette (Bragulla & Homberger, 2009), seule la kératine de type II examinée ici est exprimée par les cellules épithéliales chez *Scyliorhinus*. Cette expression ne signifie pas pour autant qu'un produit soit secrété dans la matrice extra-cellulaire, d'autant que les kératines sont considérées comme des protéines intracellulaires (Fraser, 1969). Elles sont toutefois capables d'initier la formation de cristaux d'apatite (Blakey & Lockwood, 1968) et elles peuvent également être sécrétées dans le milieu extra-cellulaire, comme le montre l'exemple du mucus de la myxine, composé entre autre de fibres kératinisées (Fudge et al., 2003; Koch et al., 1995). Des kératines sont également présentes dans les cellules épithéliales des bourgeons dentaires chez les mammifères où elles forment la cuticule de l'émail, une fine couche kératinisée recouvrant celui-ci avant qu'il ne soit fonctionnel (Bauer, 1943; Darling, 1943; Domingues et al., 2000), bien que la présence de cette structure en dehors des mammifères ne soient pas établie. Plus récemment en revanche, des kératines ont été décrites comme faisant partie de la trame organique de l'émail (Duverger et al., 2014) et s'il n'est encore une fois pas certain que ces observations soient également valides en dehors des mammifères, elles fournissent certainement quelques pistes intéressantes à explorer.

Quelques points principaux peuvent donc être dégagés des résultats obtenus dans cette partie :

i) Le développement dentaire chez *Scyliorhinus* est caractérisé par une combinaison importante de collagènes, exprimés par les odontoblastes à des moments différents au cours du développement en fonction des gènes examinés. Leur expression tardive dans les bourgeons dentaires et de denticules dermiques indiquent qu'ils contribuent principalement à la formation de la dentine. L'absence d'expression des collagènes examinés dans les cellules de l'épithélium indique également que le collagène présent dans la matrice de l'émailloïde est également synthétisé par les odontoblastes, bien qu'il soit présent en

18. Discussion

quantité nettement moins importante que dans la matrice de la dentine.

ii) La co-expression de collagène de type I par les améloblastes et les odontoblastes dans les bourgeons dentaires d'ostéichthyens possédant de l'émailloïde suggérerait que la sécrétion de collagène par les cellules de l'épithélium soit une caractéristique de ce tissu. Cette hypothèse n'est pas soutenue par les données d'expression obtenues chez *S. canicula*, ce qui indique d'une part que la production de collagène par l'épithélium n'est pas un pré-requis à la formation de l'émailloïde et d'autre part que ces tissus ne sont probablement pas homologues chez les chondrichthyens et les ostéichthyens, ce qui est également appuyé par les données d'expression de *SPARC* et *SPARC-Like*.

iii) La contribution des améloblastes à la formation de l'émailloïde est probablement restreinte à la minéralisation du tissu, ce qui est suggéré par l'expression de *SPARC-Like*. Son expression précoce dans les bourgeons de denticules dermiques (figure 35-E), avant que ceux-ci ne soient minéralisés, peut toutefois indiquer que leur rôle n'est pas limité au processus de minéralisation.

Etant donné les résultats présentés en histologie, d'autres familles de gènes pourraient être examinées pour identifier les rôles respectifs des améloblastes et des odontoblastes chez les chondrichthyens, notamment pour la possible sécrétion de protéines glycosylées dans la matrice avant sa minéralisation. D'autres pistes sont également à explorer : si la nucléation des cristaux d'apatite est nécessaire pour que l'émailloïde puisse devenir fonctionnel, processus dans lequel *SPARC-Like* est probablement impliqué, la matrice organique doit également être dégradée, ce qui est permis par des enzymes comme que les collagénases ou d'autres métalloprotéases (MMP) (Gross & Lapierre, 1962; Sire et al., 2009). L'examen des patrons d'expression de tels gènes devrait donc permettre de préciser la contribution des améloblastes à la maturation de l'émailloïde, et de voir si d'autres différences existent entre les différents groupes possédant de l'émailloïde. D'autre part, il sera également nécessaire d'examiner les patrons d'expression de ces mêmes gènes dans la dentition et les denticules dermiques de *Raja clavata*, ce qui pourra peut-être permettre d'apporter de nouveaux éléments concernant l'origine développementale de la diversité des microstructures dentaires décrites dans la première partie.

Cinquième partie .

**Développement et calcification du
squelette chez *Scyliorhinus
canicula* : approches morphologique
et moléculaire**

19. Structures squelettiques

Les dents et les denticules dermiques, abordés dans les parties précédentes, ne constituent qu'une partie du squelette des chondrichthyens, unique au sein des gnathostomes actuels. Les chondrichthyens sont en effet caractérisés par un endosquelette cartilagineux (figure 36), longtemps avancé comme un des arguments principaux de leur nature « primitive » (e.g. Brazeau & Friedman, 2014), bien qu'il s'agisse probablement d'un caractère dérivé du groupe étant donné que des traces d'ossification périchondrale sont documentées chez certaines formes fossiles (Coates et al., 1998; Coates & Sequeira, 2001; Long et al., 2015). Ce type de squelette offre certains avantages fonctionnels, notamment sa flexibilité plus importante que celle de l'os, et sa densité plus faible, ce qui est un paramètre important étant donné que les chondrichthyens ne possèdent pas de vessie natatoire (Phleger, 1998).

19.1. Calcification du squelette cartilagineux

Les tissus minéralisés des vertébrés présentent une gamme considérable de variation en termes de structure et de composition (e.g. Dahdul et al., 2012; Donoghue & Sansom, 2002), et le squelette cartilagineux des chondrichthyens peut sembler relativement simple au vu de cette diversité. Leur squelette cartilagineux présente pourtant des caractéristiques dérivées, en particulier un type de calcification unique chez les vertébrés : la calcification prismatique (e.g. Dean et al., 2005a; Dean & Summers, 2006; Janvier, 1996; Moss, 1977). Celle-ci est caractérisée par des polygones calcifiés de phosphate de calcium : les tesserae (figure 37-C-C"), connectées par un réseau fibreux et recouvrant de manière plus ou moins homogène les éléments cartilagineux du squelette interne, constitué principalement de cartilage hyalin (cartilage dont les chondrocytes ne deviennent pas hypertrophiés, se divisent et expriment du collagène de type II (Francillon-Vieillot et al., 1990)). Les tesserae forment souvent plusieurs couches distinctes dans les zones

19. Structures squelettiques

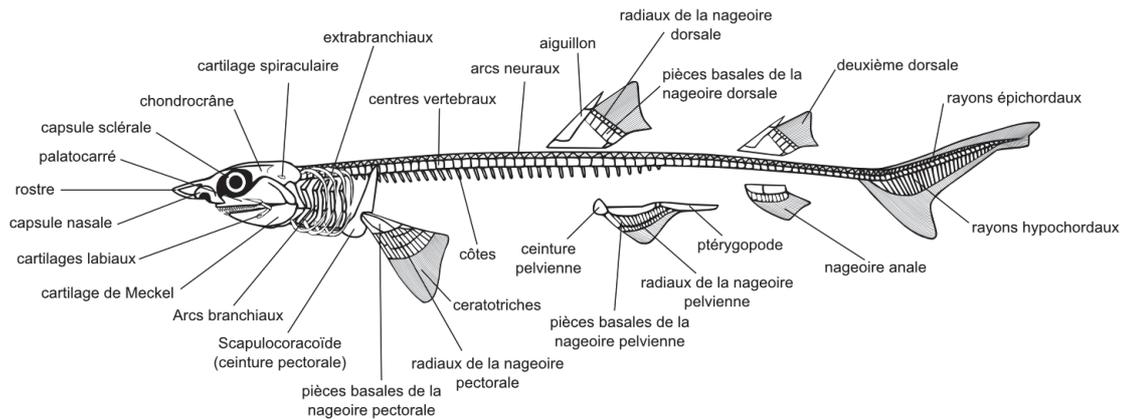


FIGURE 36. – Squelette interne schématique de néosélacien. Modifié d'après Compagno (1999)

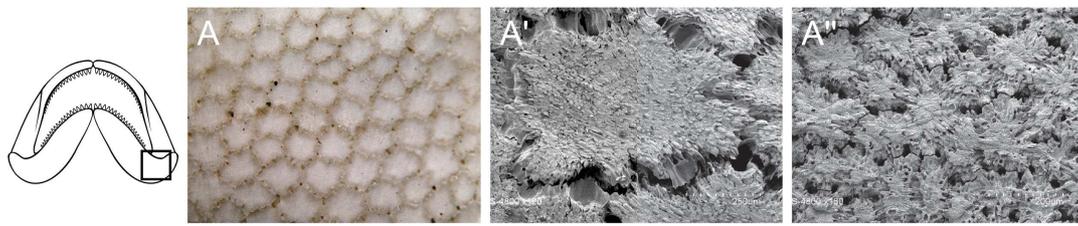


FIGURE 37. – Cartilage calcifié prismatique. **A** : tesserae de *Raja clavata* (stéréomicroscopie). Échelle : 1 mm. **A'** : tesserae de *R. clavata* en gros plan (microscopie électronique à balayage). Échelle : 125 µm. **A''** : tesserae de *Scyliorhinus canicula* (microscopie électronique à balayage). Échelle : 100µm.

du squelette soumises à un stress mécanique important, au niveau des mâchoires notamment (Dean & Summers, 2006; Dingerkus et al., 1991). Chez certaines raies durophages, les tesserae forment également des piliers continus à l'intérieur des mâchoires (*trabecular cartilage*) dont ils renforcent la structure (Summers, 2000).

La calcification du squelette cartilagineux est toutefois variable non seulement d'une espèce à l'autre (le squelette des Hexanchiformes est par exemple faiblement minéralisé tandis que celui des Squatiniformes est très calcifié; Cappetta, 2012), mais également au sein d'un même individu. En effet, d'autres types de calcification, non prismatiques, sont documentés, tels que la calcification globulaire, caractérisée par des sphérules d'hydroxyapatite d'échelle nanométrique (partie profonde des tesserae) ou la calcification aréolaire (ou vertébrale), déposée de manière concentrique au niveau du centrum (e.g. Clement, 1992; Dean & Summers, 2006). Les centres vertébraux sont couramment très calcifiés chez de nombreuses espèces, notamment certaines formes pélagiques et benthiques (e.g. Cappetta, 2012).

19.2. Présence potentielle de tissus osseux

La présence de tissus interprétés comme du tissu osseux (*bone-like tissue*) ou de cellules osseuses ont été décrits dans plusieurs éléments du squelette cartilagineux des chondrichthyens : dans les corps vertébraux de plusieurs espèces de néosélaciens (*Cetorhinus* et *Raja* (Stark, 1844)) ; dans des boucles dermiques de Rajiformes (Quekett, 1846b,a) ; à la base des dents et des denticules dermiques de plusieurs chondrichthyens paléozoïques et actuels (Karatayute-Talimaa, 1989; Reif, 1980a; Zangerl, 1966) ; dans le périchondre des arcs neuraux de la petite roussette *Scyliorhinus canicula* (Bordat, 1987; Peignoux-Deville et al., 1982; Peignoux-Deville & Janvier, 1984; Wurmbach, 1932) ; et dans le périchondre à la surface des tesserae de plusieurs Carcharhinidae (Kemp & Westrin, 1979).

Si la présence d'os chez les chondrichthyens actuels reste très débattue (Clement, 1992; Smith & Hall, 1990), leur registre fossile indique clairement que l'ossification périchondrale a été perdue au cours de l'histoire évolutive du groupe. Plusieurs fossiles (*Akmonistion*, *Stethacantus* (figure 2-L, L')) en conservent les traces à la surface de certaines pièces endosquelettiques (Coates et al., 1998; Coates & Sequeira, 2001). La présence de tissus osseux dans les éléments du squelette dermique, notamment à la base des dents et des denticules, est également débattue depuis longtemps (Moss, 1970; Zangerl, 1966), bien qu'il s'agisse vraisemblablement d'ostéodentine, un type de dentine morphologiquement très similaire à l'os (Francillon-Vieillot et al., 1990; Moyer et al., 2015).

19.3. Problématique

L'histoire évolutive du squelette cartilagineux et ses modalités de calcification demeurent donc mal connues. Les données existantes sont essentiellement restreintes à quelques espèces de sélachimorphes, ce qui ne permet pas de discuter d'évènements évolutifs ayant eu lieu à l'échelle des chondrichthyens. Les données actuelles sur la morphologie squelettique des chondrichthyens permettent notamment de poser deux grandes questions :

- La plupart des travaux portant sur le squelette cartilagineux ont été effectués sur des individus adultes ou sur des régions anatomiques bien délimitées (en général le squelette crânien) et sont principalement restreints à quelques travaux d'anatomie

19. Structures squelettiques

souvent anciens. Le développement et la calcification des éléments squelettiques des chondrichthyens au cours du développement embryonnaire demeurent donc mal connus. Dans ce contexte : i) quelles sont les parties du squelette qui sont minéralisées au cours du développement embryonnaire ? ii) leur minéralisation est-elle synchrone ou est-il possible de mettre en évidence une minéralisation séquentielle des pièces squelettiques ?

- D'autre part, sachant que le squelette des chondrichthyens est caractérisé par différents types de minéralisation, bien distincts d'un point de vue morphologique : ces différents types de calcification se produisent-ils dans un contexte moléculaire comparable ou distinct ? Est-il possible de mettre en évidence la présence de tissus osseux dans le squelette interne de la petite roussette au cours de son développement embryonnaire ? Et finalement, qu'est-ce que ces données peuvent apporter au contexte plus global de l'évolution du squelette chez les vertébrés ?

Les deux chapitres suivants sont consacrés à la mise en place et à la calcification du squelette cartilagineux chez la petite roussette, dans un contexte morphologique et moléculaire respectivement.

20. Aspects morphologiques de la squelettogénèse

Si les données moléculaires concernant la squelettogénèse chez les chondrichthyens sont encore très restreintes (e.g. Zhang et al., 2009), celle-ci est mieux documentée d'un point de vue morphologique, notamment grâce aux travaux d'anatomistes du 19^{ème} et du début du 20^{ème} siècle (e.g. de Beer, 1931; El Toubi, 1949; Garman, 1913; Gegenbaur, 1872; Goodrich, 1930; Parker, 1878). La plupart de ces descriptions réalisées sur le squelette interne sont donc relativement anciennes et se basent souvent sur des observations effectuées chez différentes espèces. Depuis quelques années, l'anatomie squelettique de nombreuses espèces est explorée par microtomographie à rayons-X dans le cadre du projet « *Chondrichthyan Tree of Life* » (Crawford & Naylor, 2015). Ces données concernent exclusivement des individus adultes ou sub-adultes, et ne permettent donc pas de discuter de la mise en place et de la minéralisation de leur squelette au cours de l'embryogenèse. Il existe toutefois des travaux importants portant sur le développement embryonnaire des chondrichthyens (e.g. Ballard et al., 1993; Balfour, 1878; Scammon, 1911), mais ceux-ci se focalisent principalement sur la morphologie externe et l'anatomie de plusieurs systèmes d'organes et n'abordent pas, ou peu, la formation du squelette cartilagineux, pourtant l'une des caractéristiques propres de ce groupe. De ce fait, les connaissances actuelles sur la squelettogénèse des poissons cartilagineux restent très fragmentaires en comparaison des données existantes chez les ostéichthyens et notamment chez les actinoptérygiens, dont le développement du squelette est beaucoup mieux connu compte tenu de leur importance comme ressources halieutiques (Gisbert et al., 2012).

Deux approches ont été adoptées ici pour visualiser et décrire les pièces squelettiques et leur calcification au cours du développement embryonnaire : la double coloration au bleu alcian et rouge d'alizarine, permettant de mettre en évidence les parties cartilagineuses

et calcifiées du squelette; et la microtomographie à rayons-X. Cette dernière est une technique d'imagerie non destructrice permettant la visualisation en trois dimensions d'objets biologiques qui sont reconstruits en fonction de leur densité. La première partie de ce chapitre est consacrée à la calcification du squelette axial, de la dentition et des denticules dermiques. Les résultats présentés sont associés à un manuscrit (disponible à la fin de ce chapitre) qui sera prochainement soumis à la revue *MorphoMuseum*, ce qui permettra d'y adjoindre les modèles anatomiques reconstruits. La seconde partie de ce chapitre traite de la morphologie et de la mise en place des éléments du squelette appendiculaire, les nageoires pectorales et pelviennes, au cours du développement embryonnaire.

20.1. Dynamique de minéralisation du squelette axial et du squelette dermique

Six spécimens à divers stades de développement embryonnaire, mesurant entre 6 et 10 centimètres (ce qui correspond approximativement à la taille d'éclosion de la petite roussette; Ellis & Shackley, 1997) ont été scannés afin de décrire la dynamique de minéralisation du squelette axial et du squelette dermique.

20.1.1. Dentition

Chez le premier embryon examiné, mesurant 6,2 cm, les dents de la première rangée sont déjà bien minéralisées (figure 38-A'), ce qui est congruent avec d'autres études morphologiques réalisées chez cette espèce (Debiais-Thibaud et al., 2011). Les dents symphysaires ne semblent pas minéralisées à ce stade, et la deuxième rangée dentaire n'est pas détectée avant la taille de 7,5 cm (figure 38-D'), tandis que la troisième rangée est visible à partir de 8 cm (figure 38-E'). A 10 cm, taille à laquelle la dentition devient fonctionnelle, la quatrième rangée dentaire n'est pas encore visible. La résolution des scans ne permet cependant pas de distinguer les cuspidés latérales, pourtant déjà présentes chez les spécimens plus jeunes. Il est possible de mettre ces dernières en évidence en microscopie électronique (figure 39-A) et par des marquages au rouge d'alizarine (figure 39-B et Debiais-Thibaud et al., 2011).

20. Aspects morphologiques de la squelettogénèse

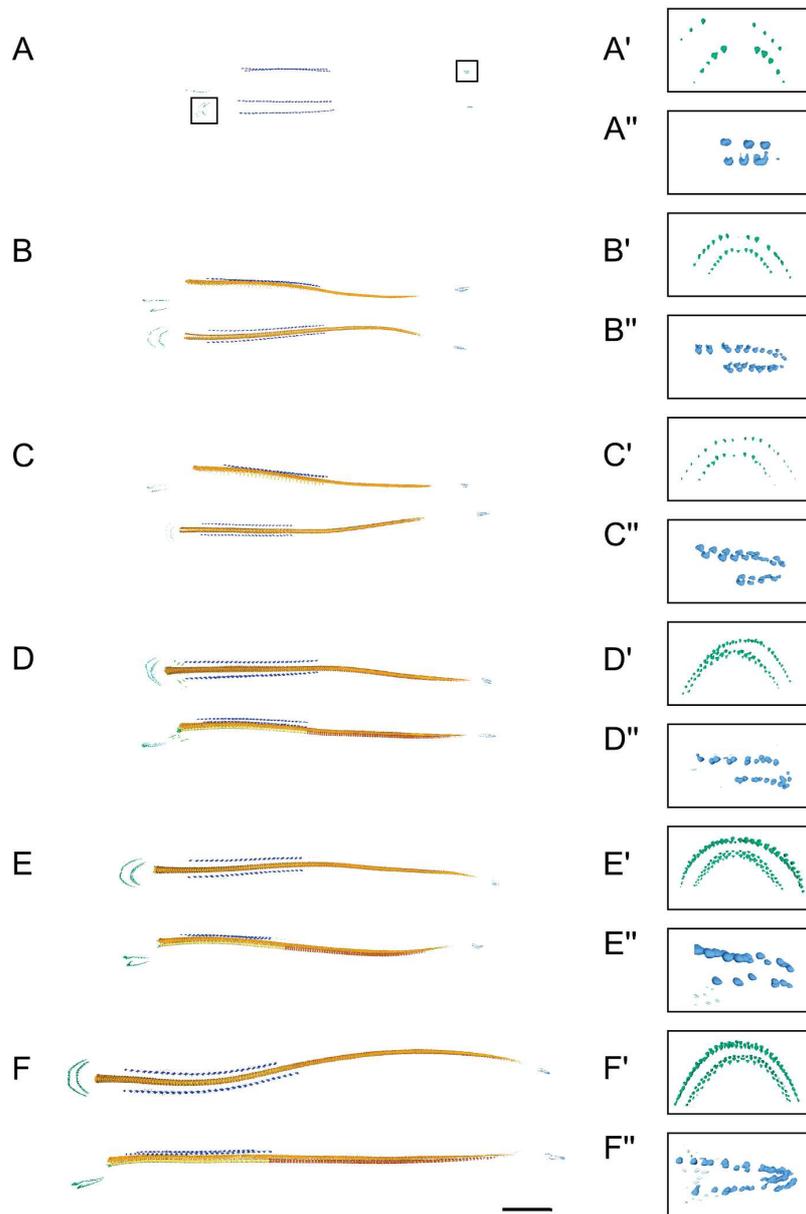


FIGURE 38. – Calcification du squelette axial et du squelette dermique au cours du développement embryonnaire de la petite roussette. **A-A''** : 6,2 cm. **B-B''** : 6,7 cm. **C-C''** : 7,1 cm. **D-D''** : 7,5 cm. **E-E''** : 8 cm. **F-F''** : 10 cm. Échelle générale : 1 cm. Les encarts latéraux illustrent la dentition en vue dorsale (') et des PCS en vue latérale (") au cours du développement embryonnaire.

20.1.2. Denticules dermiques

Trois types de denticules dermiques peuvent être distingués chez la petite roussette au cours du développement embryonnaire : les écailles primaires caudales (*Primary Caudal Scale*, PCS), les écailles primaires dorsales (*Primary Dorsal Scales*, PDS) et les denticules dermiques « classiques », recouvrant l'ensemble de la surface du corps. Les écailles primaires caudales (figure 39-C, D) sont les premières à se mettre en place lors de l'embryogenèse de la petite roussette (Debiais-Thibaud et al., 2011; Mellinger & Wrisez, 1993). Elles se développent suivant un axe caudo-rostral et sont organisées en deux rangées dorsales et ventrales à l'extrémité de la nageoire caudale. Elles sont caractérisées par un pédoncule large, une couronne plate et une symétrie radiale dans l'axe du pédoncule (figure 39-D). Seules trois PCS sont visibles dans les rangées dorsales et ventrales du spécimen de 6,2 cm. Leur éruption a pourtant lieu entre 3,8 et 5,3 cm (Mellinger & Wrisez, 1993) ce qui est illustré ici par l'observation d'un embryon de 4,8 cm en microscopie électronique (figure 39-C). Ces résultats indiquent que chez ce premier embryon de 6,2 cm les écailles les plus antérieures (les dernières à se développer) sont trop peu minéralisées pour être détectées. Seules les plus postérieures, de même nombre (3) sur les rangées dorsales et ventrales (figure 38-A"), sont suffisamment minéralisées pour être visibles. A partir de 6,7 cm, la rangée dorsale est plus développée que la rangée ventrale, une situation qui est également observable chez les embryons de taille supérieure (figure 38-B", C", D", E", F"), et toutes les écailles semblent suffisamment minéralisées pour être détectées. La rangée dorsale présente systématiquement plus d'écailles que la rangée ventrale, bien que leur nombre soit connu pour varier (Debiais-Thibaud et al., 2011; Mellinger & Wrisez, 1993).

Les écailles primaires dorsales sont bien visibles et forment une double rangée de denticules dermiques de taille importante, disposés dorso-latéralement de part et d'autre de l'axe antéro-postérieur (figure 38-A-F). Elles se mettent en place en arrière de la dernière fente branchiale et en avant de la première nageoire dorsale et leur développement se fait en direction caudo-rostrale (Mellinger & Wrisez, 1993). Elles sont déjà bien minéralisées à 6,2 cm, et jusqu'à une taille de 7,1 cm leur morphologie est très simple, avec une couronne légèrement aplatie et allongée dans l'axe antéro-postérieur (figure 38-A-C et figure 39-E). A partir de 7,5 cm, elles présentent une morphologie plus complexe, avec

20. Aspects morphologiques de la squelettogénèse

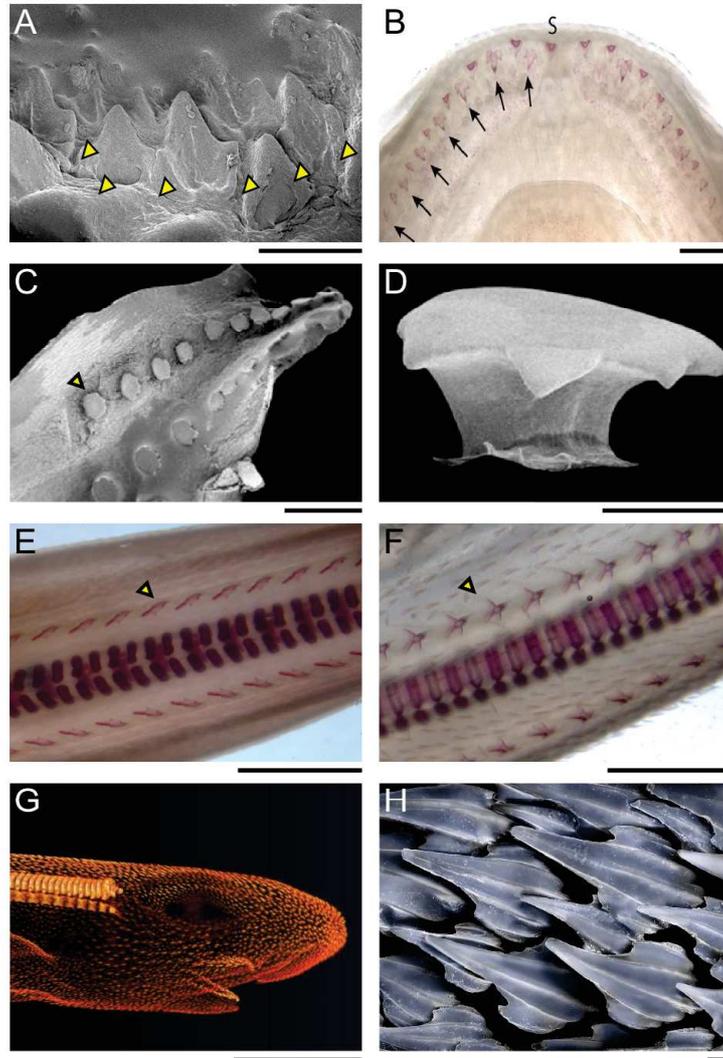


FIGURE 39. – Squelette dermique de la petite roussette. **A** : dentition embryonnaire d'un spécimen de 4,8 cm (microscopie électronique). Les cupsides accessoires sont indiquées par des flèches jaunes. Échelle : 150 μ m. **B** : dentition d'un embryon de 7,5 cm marquée au rouge d'alizarine (les dents de la deuxième rangée sont indiquées par des flèches noires). Échelle : 400 μ m. Modifié d'après Debiais-Thibaud et al. (2011). **C** : vue latérale des PCS (la plus proximale est indiquée par une flèche jaune) sur la queue d'un embryon de 4,8 cm (microscopie électronique). Échelle : 500 μ m. **D** : Vue latérale d'une PCS (microscopie électronique). Échelle : 50 μ m. **E** : Vue dorsale d'un embryon de 6,7 cm coloré au rouge d'alizarine. Échelle : 2 mm. **F** : Vue dorsale d'un embryon de 7,5 cm coloré au rouge d'alizarine. Échelle : 2mm. **G** : visualisation en trois dimensions d'un embryon de 8 cm, illustrant les denticules dermiques recouvrant le corps de manière homogène. Échelle : 0,5 cm. **H** : observation en microscopie électronique (fausses couleurs) des denticules dermiques. Photo : A. Hyde. Échelle : 100 μ m.

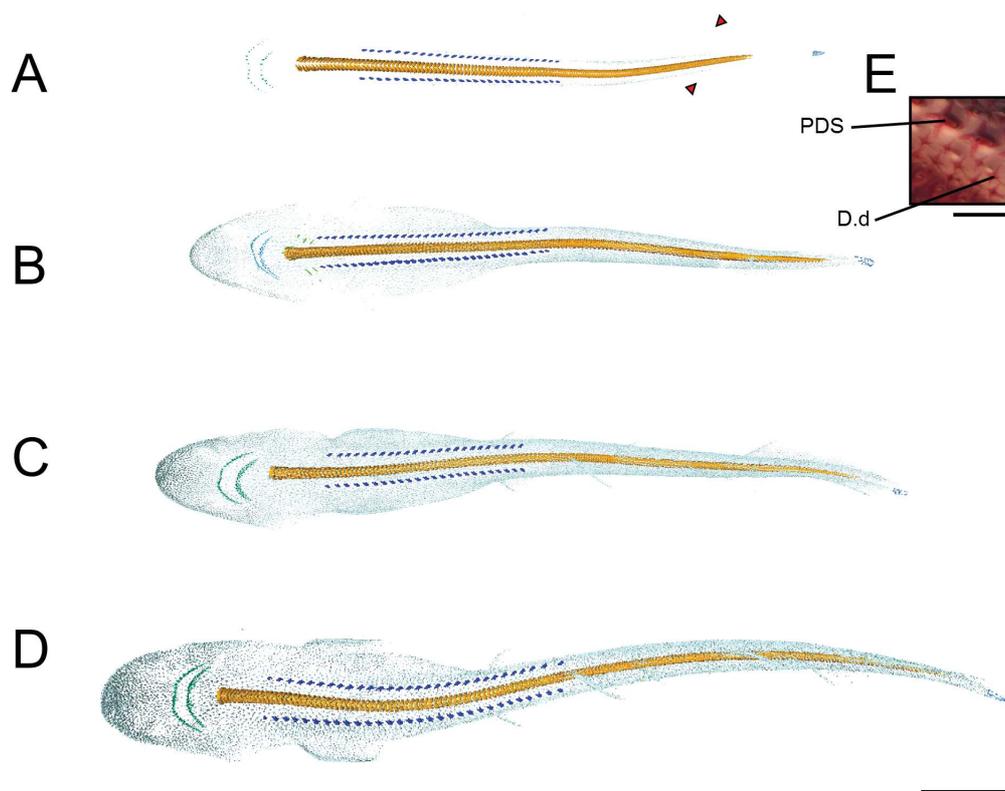


FIGURE 40. – Dynamique de calcification du squelette dermique au cours du développement de la petite roussette. **A** : 7 cm. **B** : 7,5 cm. **C** : 8 cm. **D** : 10 cm. Échelle 1 cm. **E** : morphologie des PDS et des autres denticules dermiques sur un embryon de 10 cm coloré au rouge d'alizarine. Échelle : 1 mm.

un pédoncule élargi en forme d'étoile, et une couronne cuspidée suite au redressement des denticules (figure 38-D-F et figure 39-F). Ce changement de morphologie, bien observable sur les marquages au rouge d'alizarine, correspond au moment de leur éruption. Ces écailles sont généralement au nombre de 31 par rangées, et elles sont perdues après l'éclosion (Mellinger & Wisez, 1993).

Le corps de la petite roussette est presque intégralement recouvert de denticules dermiques (figure 39-G). La morphologie de ces denticules est variable en fonction des espèces et au sein d'un même individu. Chez *Scyliorhinus*, la plupart de ces denticules présentent un pédoncule large de forme étoilée et une couronne cuspidée, fortement carénée dans la région du dos et des flancs (figure 39-H, figure 40-E).

Ces denticules dermiques sont détectés chez l'embryon de 7,1 cm (figure 40-A). Ils sont d'abord minéralisés dans la région caudale, en arrière des PDS bien qu'il semble y avoir un zone de chevauchement. A 7,5 cm, les denticules dermiques recouvrent déjà l'ensemble

20. Aspects morphologiques de la squelettogénèse

de la surface du corps, et sont bien marqués dans la région du museau (figure 40-B). Les embryons de taille supérieure (8 et 10 cm) présentent une squamation similaire, avec une densité plus importante de denticules, et un recouvrement additionnel des nageoires et de la région ventrale (figure 40-C, D).

20.1.3. Squelette axial

Aucune partie du squelette axial du plus jeune individu examiné (6,2 cm) ne semble calcifiée, et seuls certains éléments du squelette dermique sont visibles à ce stade (figure 38-A). La calcification du squelette axial débute par les arcs neuraux, dont la grande majorité (n=181 sur un total de 205 arcs neuraux pour un embryon de 10 cm) sont minéralisés entre les tailles de 6,1 cm et 6,7 cm (figure 38-A, B). Seuls les arcs neuraux les plus postérieurs, situés au niveau de la nageoire caudale, apparaissent faiblement minéralisés, et sont progressivement détectés jusqu'à la taille de 10 cm. Les premiers centres vertébraux de la région thoracique apparaissent très faiblement calcifiés à 6,7 cm (figure 38-B). et ils sont mieux visibles à partir de 7,1 cm (figure 38-C). Les centres vertébraux de la région post-pelvienne sont trop peu calcifiés pour être détectés avant la taille de 7,5cm (figure 38-D). La calcification de l'ensemble des centres vertébraux s'intensifie ensuite pendant le reste du développement embryonnaire (figure 38-E, F). A 10 cm, taille approximative de l'éclosion, seuls les derniers centres vertébraux et arcs neuraux apparaissent encore faiblement calcifiés.

Les autres éléments du squelette axial, à savoir les nageoires impaires (deux nageoires dorsales, nageoire caudale et nageoire anale) ne sont pas calcifiées au cours du développement embryonnaire. Leurs éléments squelettiques ne sont pas détectés par microtomographie, et ne sont pas marqués au rouge d'alizarine.

20.1.4. Autres structures notables

Certains scans ont également permis la détection de quelques éléments du splanchnocrâne, mais compte tenu de leur résolution, il est difficile d'affirmer avec certitude s'il s'agit des cératobranchiaux, des épibranchiaux, ou des pharyngobranchiaux. Ces éléments ont uniquement été détectés chez un embryon de 7,5 cm (figure 38-D).

20. Aspects morphologiques de la squelettogénèse

Si les structures crâniennes ne sont donc pas ou peu visibles sur les résultats obtenus en micrographie à rayons-X, quelques spécimens, non figurés dans le manuscrit inclu à la fin de cette partie, présentent en revanche une structure très minéralisée située au niveau de la capsule otique (figure 41). Ces structures ont été détectées chez un embryon de 10 cm et un juvénile de 24 cm. Elles sont symétriques, et apparemment constituées de deux éléments distincts (figure 41-A-A') qui sont jointifs chez le plus grand spécimen (figure 41-B-B'). Les chondrichthyens possèdent des otholithes de taille réduite, appelés statoconia et constitués de carbonate de calcium et/ou de phosphate de calcium. Ces structures d'origine non-squelettique (Maisey, 1987) peuvent être mono- ou polycristallines en fonction des groupes, auquel cas leur cohésion est assurée par un gel organique. Les statoconia sont souvent constituées d'une partie endogène constituée de calcite pure (Carlström, 1963; Moss, 1977) ou d'aragonite (Maisey, 1987) et d'une partie exogène, constituée par des grains de sable pénétrant dans l'oreille interne via les pores endolymphatiques, situés à proximité des spiracles (Carlström, 1963; Stewart, 1906). Ces structures semblent varier en termes de taille, d'origine et de composition au sein des chondrichthyens (Carlström, 1963) mais leur taille est estimée entre 1 et 50 μm . Cette gamme de taille ne correspond toutefois pas aux structures observées chez *S. canicula*, qui mesurent environ 150 μm pour l'individu de 10 cm et plus de 5 mm pour l'individu de 24 cm. Cette différence de taille, ainsi que leur détection chez un nombre limité d'individus (2 sur 11 individus scannés) semble également indiquer une variation importante dans la minéralisation de cette région de la capsule otique et justifierait une étude plus approfondie de cette région du squelette crânien.

20.2. Mise en place du squelette appendiculaire

Tout comme les nageoires impaires, les nageoires pectorales et pelviennes ne se calcifient pas au cours du développement embryonnaire : ces éléments ne sont pas détectés en microtomographie à rayons-X et ne sont pas marqués au rouge d'alizarine. Afin de disposer de références pour la morphologie adulte de ces pièces squelettiques et d'établir si ces éléments sont calcifiés au cours de la période post-embryonnaire, des éléments du squelette appendiculaire d'individus mâles et femelles ont été préparés et colorés au bleu alcian et rouge d'alizarine.

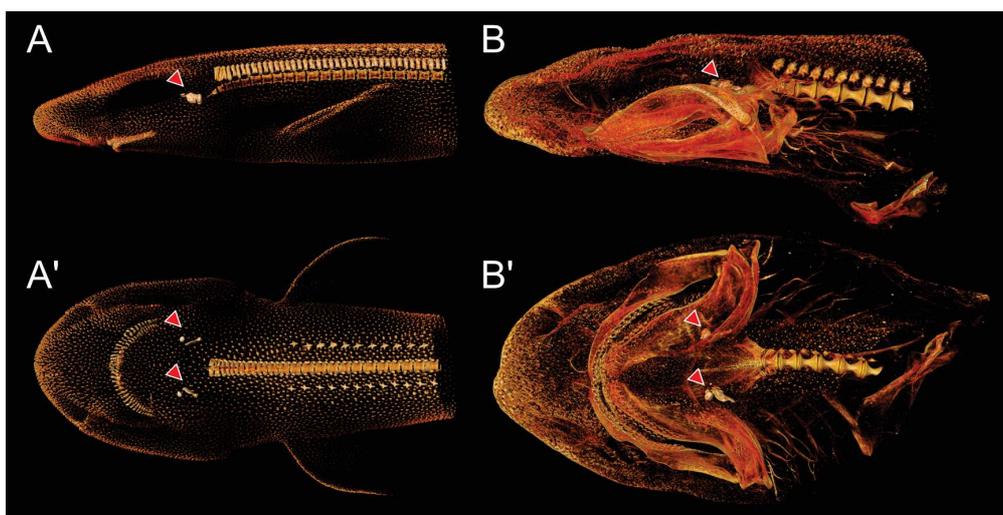


FIGURE 41. – Visualisation en trois dimensions de la région antérieure de la petite roussette. **A-A'** : embryon de 10 cm en vue latérale (**A**) et en vue ventrale (**A'**). **B-B'** : juvénile de 24 cm en vue latérale (**B**) et en vue ventrale (**B'**). Les structures détectées dans la zone otique sont indiquées par des flèches rouges.

20.2.1. Morphologie adulte

Les nageoires pectorales (figure 42-A-D) de la petite roussette sont aplésodiques, c'est à dire que les radiaux de la nageoire ne s'étendent pas jusqu'aux extrémités des nageoires, la partie distale de celles-ci étant constituée par des fibres souples, les cératotriches (figure 36).

Sur les préparations squelettiques non colorées, les pièces basales de la nageoire pectorale (proptérygium, mésoptérygium, métaptérygium) ainsi que la partie centrale de la plupart des radiaux apparaissent plus sombres que le reste du cartilage de la nageoire, ce qui indique les zones calcifiées (figure 42-B). Cette calcification est de type prismatique (figure 42-B') et reste donc limitée aux pièces basales ainsi qu'à une partie des radiaux, les plus distaux étant totalement dépourvus de calcification chez les spécimens examinés, ce qui est également confirmé par les marquages au bleu alcian et rouge d'alizarine (figure 42-C, D).

Les nageoires pelviennes (figure 42-E-H) présentent également une calcification de type prismatique (figure 42-G') au niveau de la barre ischiopubique (ceinture pelvienne), du proptérygium pelvien, du basiptérygium et de la majeure partie des radiaux (figure 42-G, H). Les extrémités proximales du basiptérygium et des radiaux, qui correspondent à des zones d'articulation sont particulièrement marquées par le rouge d'alizarine en double

20. Aspects morphologiques de la squelettogénèse

coloration (figure 42-G). Les ptérygopodes, composés de plusieurs pièces de cartilage sont également fortement marqués au rouge d'alizarine, bien qu'aucune tesserae ne soit visible à la surface de ces derniers (figure 42-G"). Cette particularité, suggérant un autre type de calcification, est inattendue dans la mesure où cette structure dérive probablement du basiptérygium (Compagno, 1999).

20.2.2. Nageoires pectorales

La figure 43 illustre la formation du squelette des nageoires pectorales et leur relation au reste de l'endosquelette (figure 43-A). Le plus jeune embryon échantillonné ici, mesurant 3,3 cm, présente déjà des cartilages bien développés au niveau des nageoires pectorales (figure 43-B). Les pièces basales sont formées, ainsi que la première rangée de radiaux (radiaux proximaux), qui sont encore largement espacés les uns des autres. A 4,2 cm (figure 43-C), la deuxième rangée de radiaux (radiaux médiaux) est déjà visible, et une large bande cartilagineuse, mal définie, est présente distalement. Les radiaux proximaux sont également plus rapprochés. A 5,1 cm (figure 43-D) les radiaux médiaux sont mieux individualisés, et la bande de cartilage située dans leur prolongement est mieux définie. Le squelette des pectorales des embryons de 6,2 et 6,8 cm (figure 43-E, F) est très similaire. La bande de cartilage distale présente chez les embryons de taille inférieure est maintenant bien individualisée et forme les radiaux distaux. Leur bordure distale reste toutefois mal définie ce qui suggère que leur formation n'est pas encore achevée à ces stades. A partir de 7,1 cm, et jusqu'au dernier spécimen échantillonné, mesurant 8 cm, la formation des cartilages des nageoires pectorales semble achevée (figure 43-G-I). Les radiaux distaux sont bien formés et individualisés, et la configuration des pièces cartilagineuses correspond aux observations effectuées chez les adultes (figure 42-A-D).

Le squelette des nageoires pectorales est donc mis en place rapidement au cours de l'embryogénèse, une morphologie de type adulte étant visible dès 6,2 cm. La calcification de ces pièces squelettiques en revanche, semble se produire plus tardivement au cours de la croissance de l'animal, et reste principalement associée à la partie proximale de la nageoire.

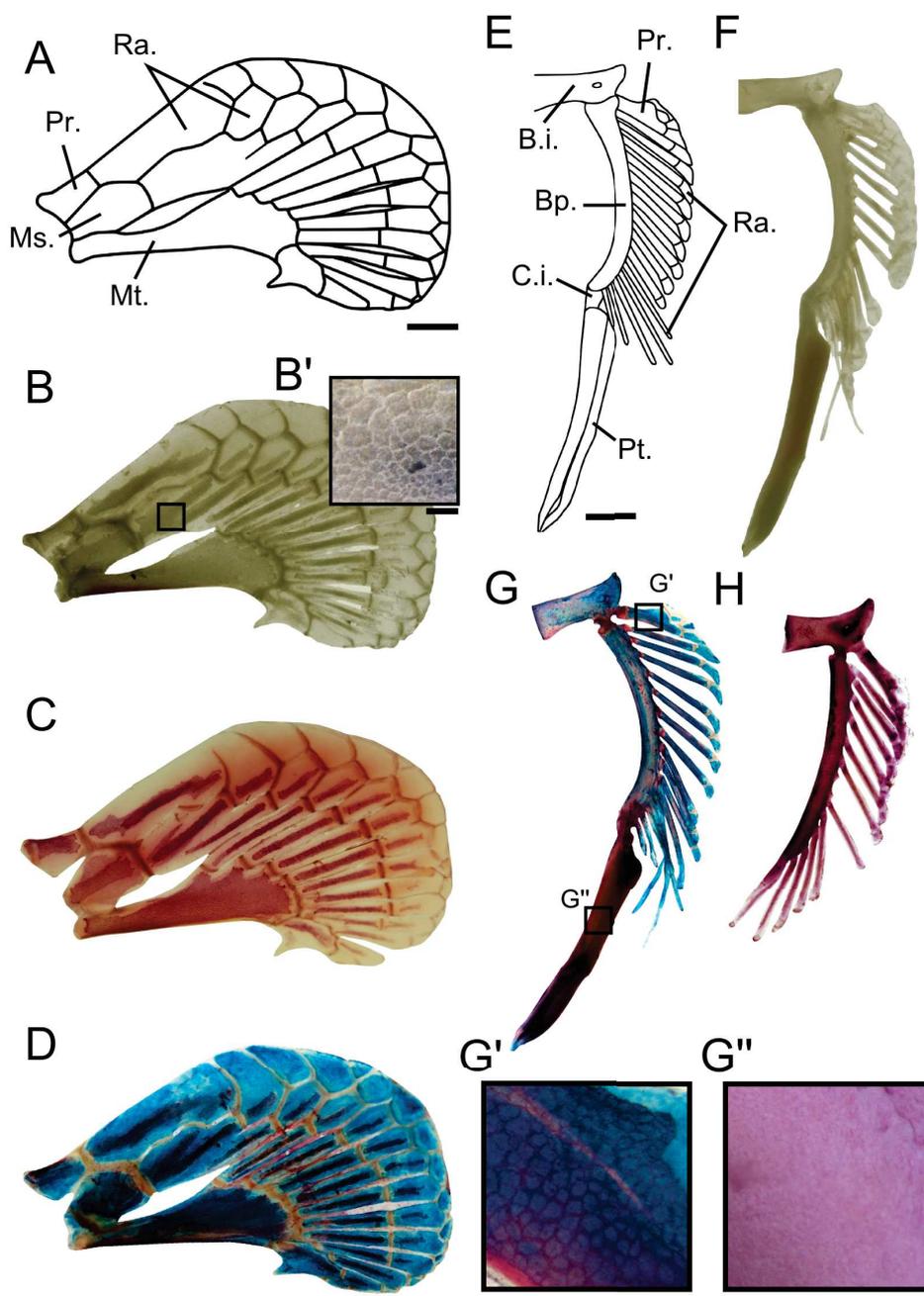


FIGURE 42. – Morphologie adulte du squelette appendiculaire chez *S. canicula*. **A-D** : nageoire pectorale. **A** : représentation schématique du squelette de la nageoire pectorale. **B** : squelette de la nageoire pectorale. **B'** : détail des tesserae. Échelle : 0,25 cm. **C** : nageoire pectorale colorée au rouge d'alizarine. **D** : nageoire pectorale colorée au bleu alcian et rouge d'alizarine. Échelle : 0,5 cm. **E-H** : nageoire pelvienne. **E** : représentation schématique du squelette de la nageoire pelvienne d'un spécimen mâle. **F** : squelette de la nageoire pelvienne d'un spécimen mâle. **G** : nageoire pelvienne d'un spécimen mâle coloré au bleu alcian et rouge d'alizarine. **G'** : détail des tesserae. Échelle : 0,5 mm. **G''** : détail du ptérygopode. Échelle : 0,25 mm. **H** : nageoire pelvienne d'un spécimen femelle coloré au rouge d'alizarine. Échelle : 1 cm.

20. Aspects morphologiques de la squelettogénèse

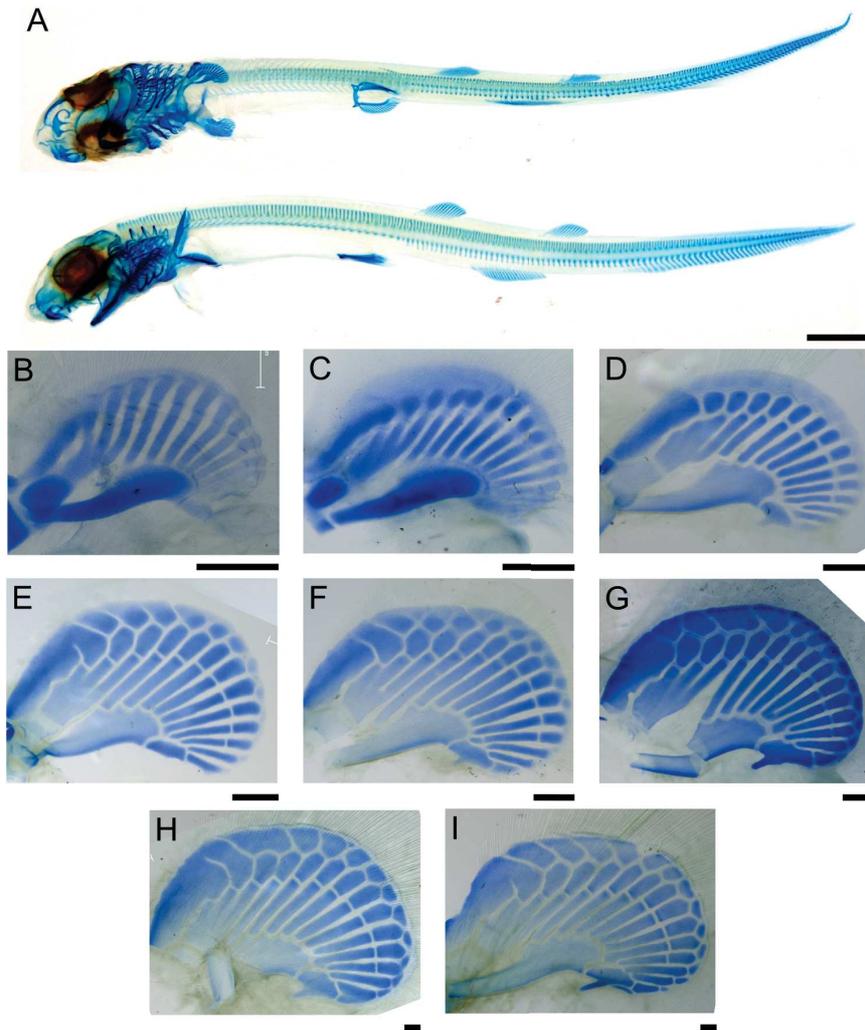


FIGURE 43. – Endosquelette de *S. canicula* et développement du squelette des nageoires pectorales au cours de l'embryogenèse **A** : embryon de 6,5 cm coloré au bleu alcian. Échelle : 5 mm. **B-I** : formation du squelette des nageoires pectorales chez des embryons de **B** : 3,3 cm. **C** : 4,2 cm. **D** : 5,1 cm. **E** : 6,2 cm; **F** : 6,8 cm. **G** : 7, 1 cm. **H** : 7,5 cm. **I** : 8 cm. Échelle : 0,5 mm.

20.2.3. Nageoires pelviennes

La figure 44 illustre la formation des nageoires pelviennes au cours du développement embryonnaire de *S. canicula*. A 3,3 cm la ceinture pelvienne et les basipterygia sont déjà visibles, colorés par le bleu alcian (figure 44-A). Plusieurs radiaux peuvent également être distingués, mais ils sont très faiblement marqués. La morphologie des pièces cartilagineuses de l'embryon de 4,2 cm est très similaire (figure 44-B) et les différents radiaux, y compris les propterygia pelviens, sont légèrement plus visibles. En revanche à 5,1 cm les embryons présentent des nageoires pelviennes dont le squelette est presque complètement formé (figure 44-C). La bordure distale de la seconde série de radiaux n'est pas encore bien définie et les cartilages terminaux, situés dans le prolongement des basipterygia (figure 44-C, flèche jaune) sont déjà partiellement visibles. Ces observations caractérisent également le squelette pelvien des embryons de 6,2 et de 6,8 cm (figure 44-D, E). A partir de l'embryon de 7,1 cm le squelette pelvien est complètement développé (figure 44-F). Sa morphologie est constante jusqu'au plus vieux spécimen échantillonné, mesurant 9 cm (figure 44-G, H). Tous les cartilages terminaux sont visibles, et la seconde série de radiaux est bien définie. Si la formation du squelette pelvien semble moins « progressif » que celui des nageoires pectorales (ce qui est illustré par la différence importante de développement des pièces cartilagineuses entre les embryons de 4,2 et de 5 cm), il est intéressant de noter que l'acquisition d'une morphologie « adulte » se produit simultanément dans le squelette des nageoires pectorales et celui des nageoires pelviennes, chez des embryons d'environ 7 cm de long. Cette période semble particulièrement importante dans la squelettogénèse de *S. canicula* dans la mesure où elle correspond également à la minéralisation des centres vertébraux de la région thoracique, décrite dans une section précédente, ceux de la région post-pelvienne n'étant minéralisés que plus tardivement au cours du développement embryonnaire.

Le développement du squelette des nageoires pelviennes permet également de s'intéresser à la formation des ptérygopodes, les organes copulateurs mâles dérivés de la nageoire pelvienne et qui caractérisent les chondrichthyens. Ces structures, possédant une structure squelettique complexe, peuvent être particulièrement développées chez certaines espèces, notamment au sein des rajiformes (Compagno, 1999). Peu de données étaient cependant disponibles sur leur mise en place au cours du développement embryonnaire

20. Aspects morphologiques de la squelettogénèse

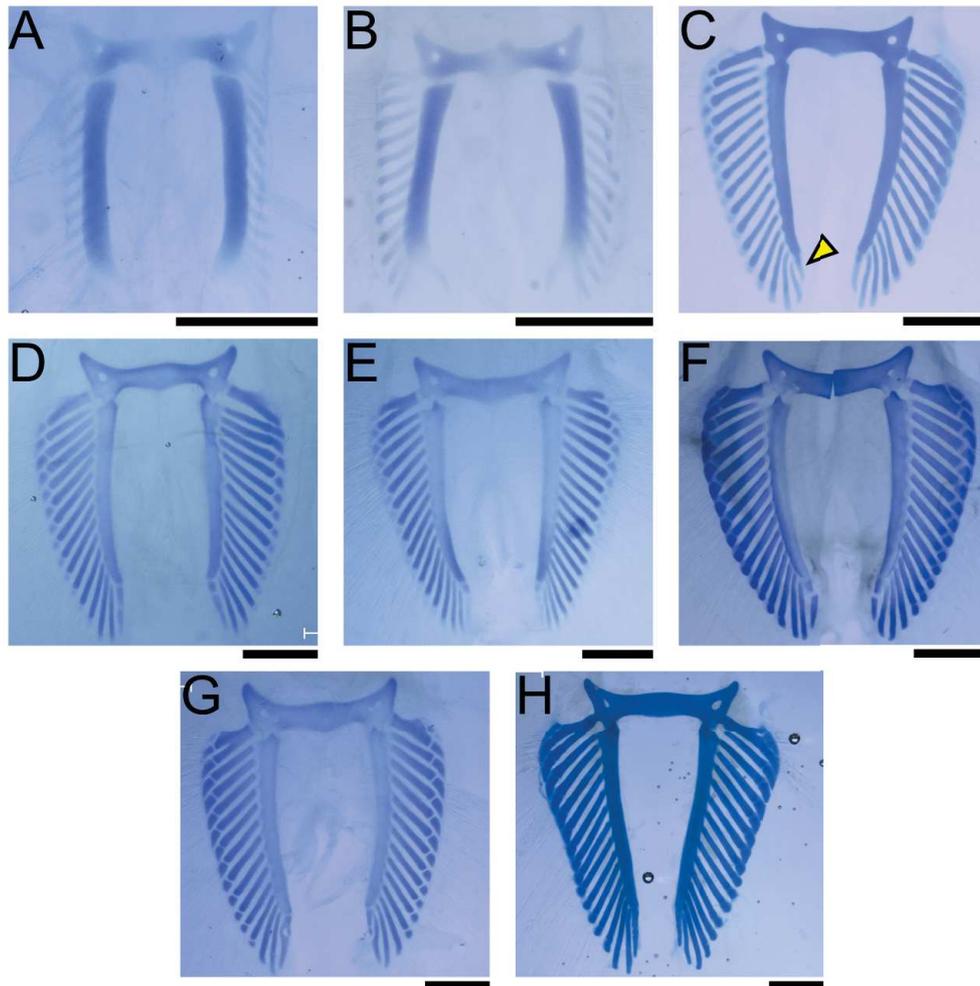


FIGURE 44. – Développement du squelette des nageoires pelviennes de *S. canicula* au cours de l'embryogénèse. **A** : nageoires d'un embryon de 3,3 cm. **B** : 4,2 cm. **C** : 5,1 cm. **D** : 6,2 cm. **E** : 6,7 cm. ; **F** : 7,1 cm. **G** : 7,5 cm. **H** : 9 cm. Échelle : 1 mm.

20. Aspects morphologiques de la squelettogénèse

avant la publication récente des travaux de OShaughnessy et al. (2015), portant sur *Leucoraja erinacea*. Les auteurs y mettent en évidence l'activation prolongée de la voie de signalisation Sonic hedgehog (*Shh*) dans la région distale de la nageoire pelvienne des mâles. Si seuls ces derniers possèdent des ptérygopodes, le basiptérygium des femelles est également prolongé par plusieurs pièces cartilagineuses (cartilages terminaux), dont le nombre est variable.

Plusieurs embryons ont été examinés afin de déterminer à quel moment les structures squelettiques associées à la partie distale de la nageoire pelvienne se mettent en place. Les résultats obtenus (figure 45) montrent que les embryons les plus jeunes, mesurant entre 3 et 4 cm, peuvent déjà être distingués sur la morphologie des nageoires pelviennes. Chez les femelles, celles-ci sont allongées (figure 45-A), tandis que chez les mâles la partie distale est distinctement élargie (figure 45-B, flèche jaune). En revanche le squelette de la nageoire pelvienne ne montre aucune différence entre ces embryons (figure 45-A', B'), et aucune pièce squelettique supplémentaire n'est observable dans le prolongement du basiptérygium. Chez des embryons dont la taille est comprise entre 4 et 5 cm, la nageoire pelvienne est plus développée, et la distinction est toujours possible entre les deux sexes en se basant sur la morphologie externe (figure 45-C, D). A ce stade les caractéristiques squelettiques de la nageoire pelvienne sont très différentes : chez les femelles, les radiaux sont sub-égaux et régulièrement espacés jusqu'à l'extrémité distale du basiptérygium, au niveau de laquelle les cartilages terminaux sont déjà visibles. En revanche chez les mâles (figure 45-D'), les radiaux distaux sont très différents : certains sont très allongés tandis que les plus distaux sont beaucoup plus courts, une morphologie également observable chez les spécimens adultes. Un espace important est visible entre les derniers radiaux et les cartilages des ptérygopodes, dont une partie est déjà visible. Le basiptérygium est également beaucoup plus courbé que chez les spécimens femelles, un caractère également observable chez les adultes. A partir de 7 cm, les spécimens ne présentent pas de différences importantes avec les stades précédent d'un point de vue morphologique (figure 45-E, F), mais les pièces squelettiques situées dans l'axe du basiptérygium, qu'il s'agisse des pièces du ptérygopode ou des cartilages terminaux, sont plus développées. Ces résultats montrent que si la distinction entre les deux sexes semble pouvoir être faite assez tôt dans le développement sur la base de la morphologie externe, le développement des structures squelettiques associées à la partie distale du basiptérygium ne se produit

20. Aspects morphologiques de la squelettogénèse

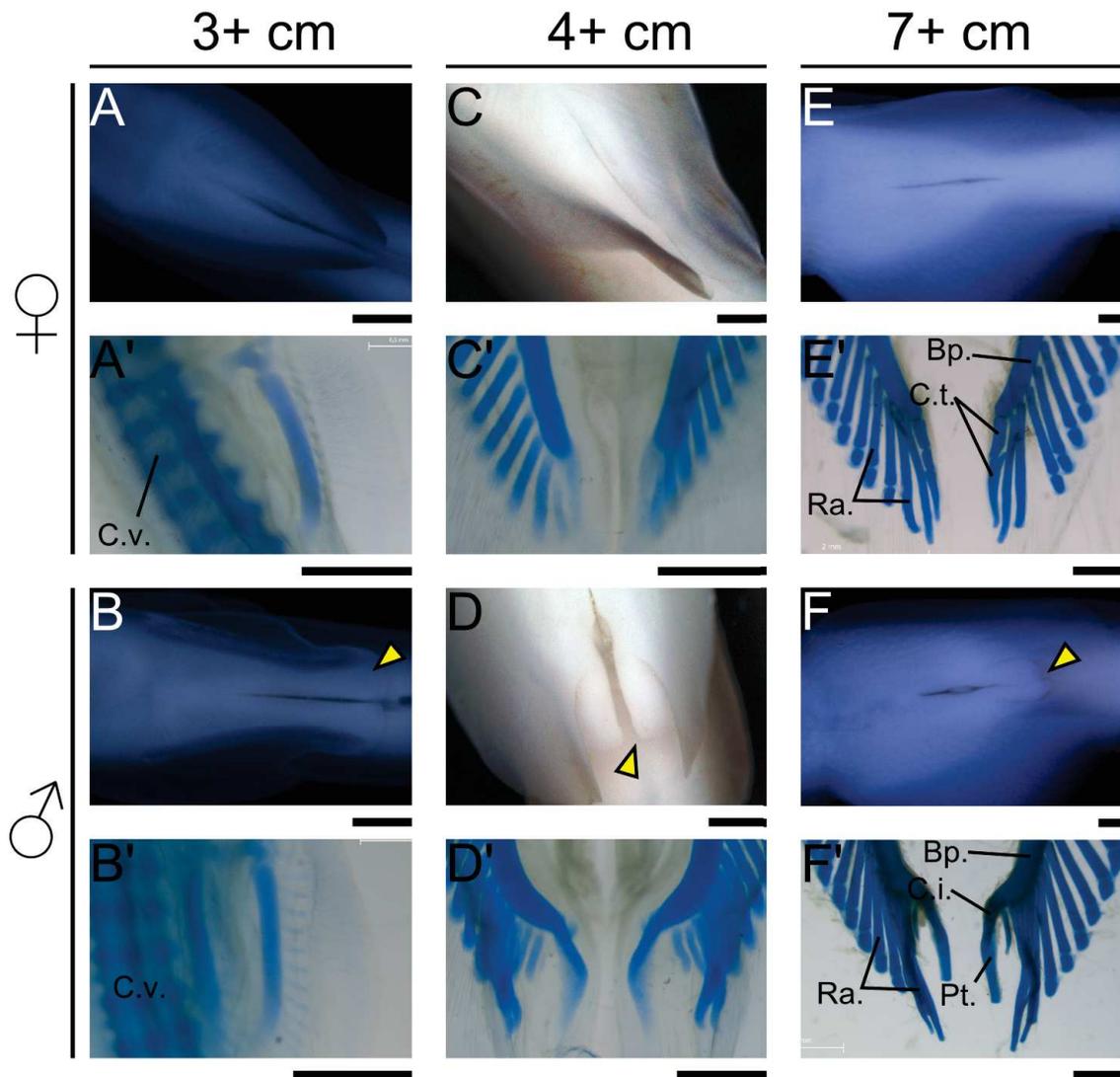


FIGURE 45. – Morphologie des nageoires pelviennes et formation des ptérygopodes au cours du développement embryonnaire de *S. canicula*. **A** : embryon de 3,5 cm. **A'** : 3,9 cm. **B** : 3,8 cm. **B'** : 3,8 cm. **C** : 4,7 cm. **C'** : 4,7 cm. **D** : 4,8 cm. **D'** : 4,8 cm. **E** ; 7,5. **E'** : 8,2 cm. **F** ; 7,5 cm. **F'** : 8 cm. **A, C, E** : Mâles ; **B, D, F** : Femelles. Échelle : 0,5mm.

20. Aspects morphologiques de la squelettogénèse

que plus tardivement. La mise en place des cartilages terminaux chez les femelles et des pièces squelettiques du ptérygopode chez les mâles se fait dans la même période de temps, avant l'éclosion, et la croissance de ces structures se poursuit ensuite au cours du développement des mâles. Ces données sont également comparables tant en termes de morphologie externe que de structures squelettiques avec les résultats obtenus chez *Leucoraja* par OShaughnessy et al. (2015), ce qui laisse supposer que cette séquence doit être conservée à l'échelle des néosélaciens.

21. Approche moléculaire de la squelettogénèse au cours du développement embryonnaire

Comme abordé dans le chapitre précédent, les chondrichthyens présentent des tissus minéralisés spécifiques tels que la calcification prismatique (Dean et al., 2005a; Dean & Summers, 2006; Dean et al., 2009), la calcification aréolaire du centrum (Eames et al., 2007; Dean & Summers, 2006; Peignoux-Deville et al., 1982; Porter et al., 2007) ou la calcification des arcs neuraux (Eames et al., 2007; Peignoux-Deville et al., 1982), dont l'homologie avec les tissus minéralisés des ostéichthyens n'est pas bien établie (Zhang et al., 2009). Si la description de cellules osseuses dans les arcs neuraux de la petite roussette reste très débattue, il ne fait aucun doute que certaines pièces squelettiques des chondrichthyens puissent être fortement calcifiées. Les connaissances portant sur la matrice extra-cellulaire de ces pièces sont toutefois encore limitées.

Chez les ostéichthyens, les différents types de cartilages (cartilage hyalin, cartilage élastique, fibrocartilage, ceux-ci étant définis sur des critères histologiques) sont produits par des cellules spécialisées, les chondroblastes, tandis que les ostéoblastes et les ostéocytes sont responsables de l'ossification (Hall, 2005). Ces cellules sécrètent une matrice protéique principalement composée de collagènes et de glycosaminoglycanes, qui peut ensuite être calcifiée suite à la précipitation de phosphate de calcium (Francillon-Vieillot et al., 1990). Les chondroblastes expriment notamment du collagène de type II, également exprimé par les cellules osseuses de manière beaucoup moins prononcée. En revanche, les ostéoblastes expriment préférentiellement des collagènes de type I (Albertson et al., 2010; Eames et al., 2012).

Afin de caractériser la nature de la matrice extra-cellulaire au niveau de ces sites de

21. Approche moléculaire de la squelettogénèse au cours du développement embryonnaire

calcification, plusieurs pièces squelettiques ont été échantillonnées chez des embryons de 7 à 9 cm de long. Les patrons d'expression des principaux collagènes fibrillaires du clade A (Wada et al., 2006) *Col1a1*, *Col1a2* et *Col2a1*, ont été examinés. L'implication de ces gènes dans les processus de biominéralisation et leur association étroite au développement du squelette est en effet bien établie (Landis & Silver, 2009; Wada et al., 2006; Zhang et al., 2009). Les patrons d'expression de ces collagènes ont donc été examinés chez la petite roussette (*Scyliorhinus canicula*) mais également chez un tétrapode, le xénope (*Xenopus tropicalis*) afin de pouvoir replacer les observations réalisées dans le contexte plus large de l'évolution du squelette chez les vertébrés. Les données d'expression de gènes chez le xénope proviennent du laboratoire de Sylvain Marcellini, de l'Université de Concepción, au Chili, avec qui une collaboration est en cours afin de disposer de données comparatives pour nos modèles respectifs. Ces résultats ont fait l'objet d'un article paru dans *Frontiers in Genetics*, disponible à la fin de cette partie. L'accent sera mis sur les données obtenues chez la petite roussette dans la présentation des résultats et la discussion.

Ces résultats sont également complétés par des données d'expression de collagènes du clade B : *Col11a1* et *Col11a2*. Comme les collagènes de type II, les collagènes de type XI sont spécifiques de l'activité des chondrocytes (Vuorio & De Crombrughe, 1990; Wada et al., 2006). Les patrons d'expression de deux gènes supplémentaires, *SPARC* et *SPARC-Like* ont également été examinés, en raison de leur implication dans les processus de biominéralisation (Kawasaki et al., 2004).

21.1. Identité moléculaire des sites de calcification

La notion d'« identité moléculaire » abordée ici fait référence aux patrons d'expression des gènes sélectionnés dans ce travail, ou à la combinaison de ces derniers, permettant de caractériser les différents sites de calcification. Cette identité moléculaire est ainsi complémentaire de leur identité morphologique (définie par le type de calcification : tesserae, globulaire, aréolaire...) et il s'agit d'établir si un type de calcification morphologiquement bien défini est également caractérisé par une identité moléculaire propre, ou si au contraire des sites de calcification morphologiquement distincts sont caractérisés par les mêmes patrons d'expression de gènes, partageant ainsi une même identité

21. Approche moléculaire de la squelettogénèse au cours du développement embryonnaire moléculaire.

21.1.1. Calcification et données d'expression des collagènes de type I et II

La double coloration des sections transversales de nageoire pectorale (figure 46-A) indique que les radiaux cartilagineux ne sont pas calcifiés chez les stades examinés (figure 46-C, C'), ce qui correspond aux résultats présentés dans la description morphologique du squelette appendiculaire. Les collagènes *Col1a1* et *Col1a2* sont exprimés dans le péri-chondrium qui entoure les pièces cartilagineuses (figure 46-D, E'). En revanche, *Col2a1* est transcrit dans les chondrocytes de la matrice cartilagineuse des radiaux (figure 46-F, F').

Les tesseræ sont bien visibles sur les sections réalisées dans le cartilage de Meckel (figure 46-H). Celles-ci sont situées en périphérie de la pièce cartilagineuse mais pas directement à la surface de celle-ci contrairement à ce qui est facilement observable chez des individus adultes : leur formation et calcification initiales se produisent à l'intérieur de la matrice cartilagineuse du cartilage de Meckel. Elles sont bien marquées au rouge d'alizarine (figure 46-J), et sont également caractérisées par un marquage plus foncé que la matrice cartilagineuse dans les coupes colorées à l'HES (figure 46-J'). *Col1a1* ne semble pas exprimé sur les coupes examinées. Il est cependant fortement exprimé dans les denticules dermiques servant de contrôle positif (figure 46-K, K'). *Col1a2* est en revanche exprimé dans les cellules du péri-chondrium entourant le cartilage de Meckel (figure 46-L, L'). *Col2a1* est exprimé dans les chondrocytes du cartilage de Meckel (figure 46-M, M'). Les données d'immunofluorescence confirment la présence de la protéine de *Col2a1* dans les pièces cartilagineuses (figure 46-G, G' ; N, N').

Dans les vertèbres, deux zones calcifiées sont mises en évidence : la zone périphérique des arcs neuraux et une fine zone de transition entre le cordon fibreux de la notochorde et la partie cartilagineuse du centre vertébral (figure 47-E, E'). Les zones calcifiées sont associées à un marquage HES plus intense que le reste de la matrice cartilagineuses (figure 47-F, G). *Col1a1* et *Col1a2* sont fortement exprimés dans les cellules du péri-chondre entourant les pièces cartilagineuses, et également dans les cellules incluses dans la partie minéralisée des arcs neuraux. En revanche aucun des deux collagènes de type I n'est visible dans la partie calcifiée située autour du cordon de la notochorde (figure 47-H-I').

21. Approche moléculaire de la squelettogénèse au cours du développement embryonnaire

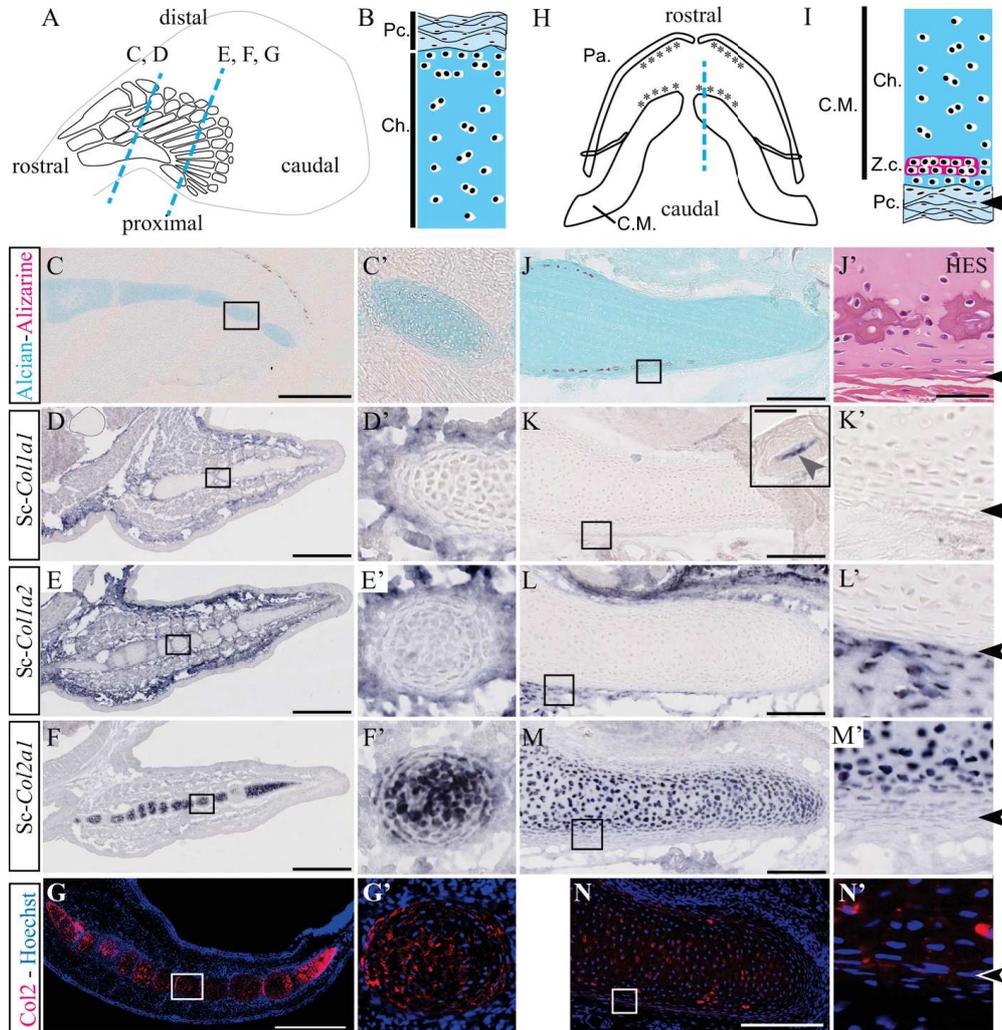


FIGURE 46. – Calcification et expression de collagènes dans les radiaux et le cartilage de Meckel de la petite roussette. **A** : illustration schématique d'une nageoire pectorale avec indication des sens de coupe. **B** : histologie schématique du squelette de la nageoire pectorale. **C-C'** : double coloration des radiaux de la nageoire pectorale au bleu alcian et rouge d'alizarine. **D-F'** : patrons d'expression des collagènes 1a1 (D-D'), 1a2 (E-E') et 2a1 (F-F') dans les radiaux. **G-G'** : immunofluorescence avec un anticorps anti-collagène type II, marquant la matrice cartilagineuse des radiaux. **H** : illustration schématique d'une mâchoire de *S. canicula* en vue ventrale, illustrant le plan de coupe. **I** : histologie schématique du cartilage de Meckel. **J** : double coloration d'une section de cartilage de Meckel au bleu alcian et rouge d'alizarine. **J'** : agrandissement d'une tessera marquée à l'HES. **K-M'** : patrons d'expression des collagènes 1a1 (K-K'), avec un agrandissement d'un denticule dermique où Coll1a1 est exprimé, 1a2 (L-L') et 2a1 (M-M'). **N-N'** : immunofluorescence avec un anticorps anti-collagène type II, marquant la matrice cartilagineuse du cartilage de Meckel. Échelles : figures **C-G** : 250 µm ; figures **J-N** : 100 µm. Modifié d'après Enault et al. (2015b).

21. Approche moléculaire de la squelettogénèse au cours du développement embryonnaire

Col2a1 est exprimé par les chondrocytes situés dans le corps vertébral, mais ne semble pas être transcrit dans la zone calcifiée autour du cordon de la notochorde (figure 47-J, J'). Les données d'immunofluorescence indiquent également que les zones de calcification sont dépourvues de collagène de type II (figure 47-K, K').

21.1.2. Données d'expression des collagènes de type XI et des SPARCs

Les coupes utilisées pour les collagènes de type XI et des SPARCs n'ont pas permis de vérifier leur expression dans les radiaux cartilagineux de la nageoire pectorale, et seuls le cartilage de Meckel et les vertèbres sont considérés ici. Les collagènes de type XI présentent des patrons d'expression identiques au collagène de type II. Ils sont transcrits dans les chondrocytes du cartilage de Meckel, mais pas dans le péri-chondrium (figure 48-A-B') et le signal de *Col11a2* est plus faible que *Col11a1*.

SPARC-Like n'est transcrit ni dans la matrice cartilagineuse ni dans le péri-chondrium (figure 48C, C'), mais il est fortement exprimé dans les éléments du squelette dermique, ce qui est illustré par l'encart de la figure 48-C et par les résultats de la partie précédente. *SPARC* semble très faiblement transcrit dans le cartilage de Meckel (figure 48-D, D'), et il est fortement exprimé dans le mésenchyme des denticules dermiques (figure 48-D, encart).

L'expression de ces gènes au sein des éléments vertébraux est similaire aux observations effectuées dans le cartilage de Meckel. *Col11a1* et *Col11a2* présentent des patrons d'expression très similaires à *Col2a1* : ils sont exprimés dans les chondrocytes du corps vertébral et des arcs neuraux, mais ni dans la partie minéralisée des arcs neuraux ni dans la zone de calcification située autour de la notochorde (figure 48-E-F'). Aucune expression de *Sparc-Like* n'est détectée dans les éléments vertébraux (figure 48-G, G') tandis que *SPARC* est faiblement transcrit au niveau des arcs neuraux (figure 48-H, H').

21.2. Discussion

Les données morphologiques et moléculaires obtenues sur le développement et la calcification du squelette de *S. canicula* permettent de répondre à plusieurs questions soulevées

21. Approche moléculaire de la squelettogénèse au cours du développement embryonnaire

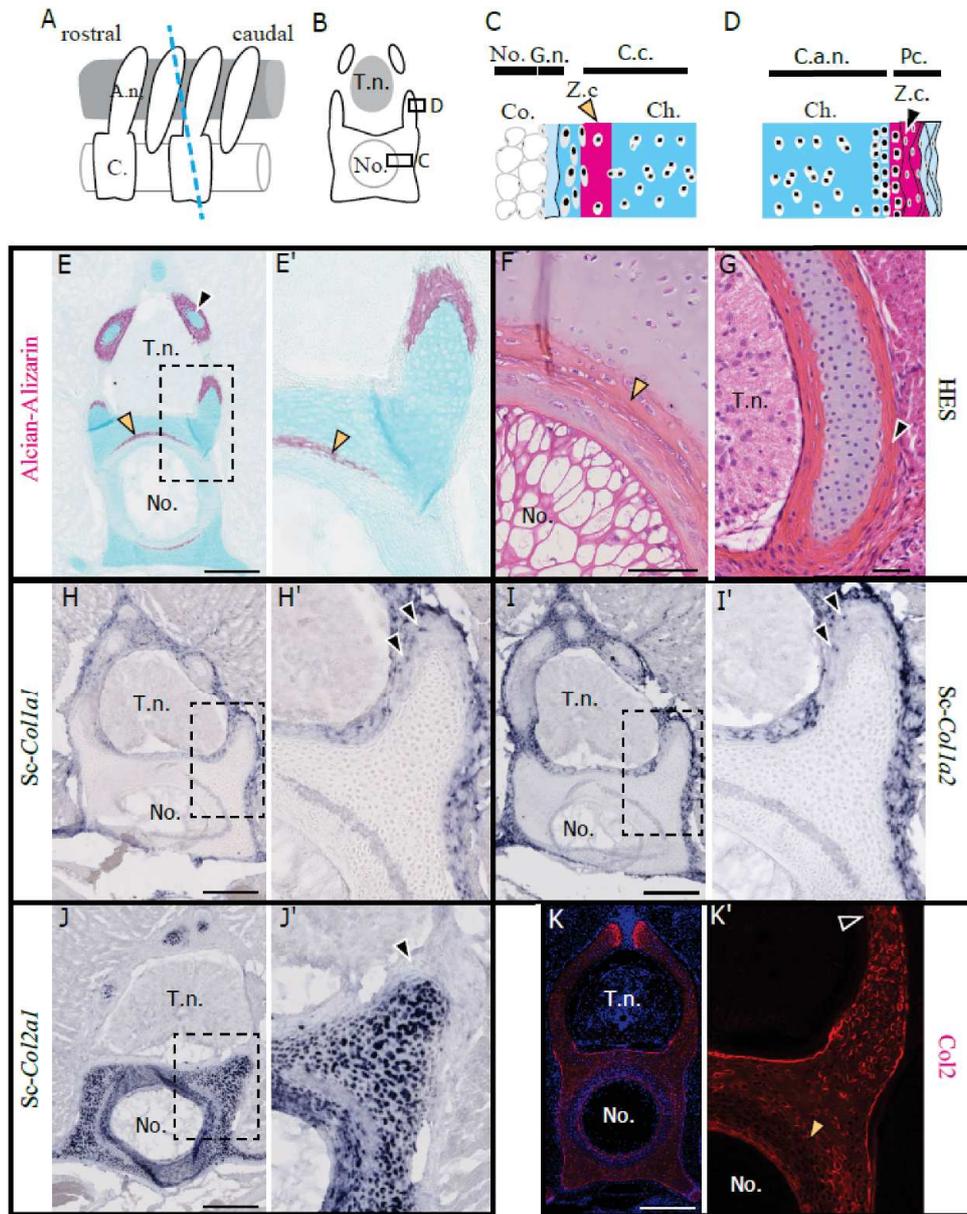


FIGURE 47. – Calcification et expression de collagènes dans les vertèbres de la petite roussette. **A-B** : illustration schématique des vertèbres en vue latérale (A) et en section transversale (B). **C** : histologie schématique du centre vertébral. **D** : histologie schématique des arcs neuraux. **E-E'** : double coloration d'une section transversale de vertèbre. Deux zones calcifiées sont visibles : autour de la notochorde (flèche jaune) et au niveau des arcs neuraux (flèche noire). **F-G** : centrum (F) et arc neural (G) colorés à l'HES. **H-J'** : patrons d'expression des collagènes *1a1* (H-H'), *1a2* (I-I') et *2a1* (J-J') dans les vertèbres. **K-K'** : immunofluorescence avec un anticorps anti-collagène type II, marquant la matrice cartilagineuse du centre vertébral, le centre des arcs neuraux, et une zone réduite entre la notochorde et le cordon fibreux entourant celle-ci. Échelles : figures **E, H-K** : 200 µm ; figure **F-G** : 50 µm. Modifié d'après Enault et al. (2015b).

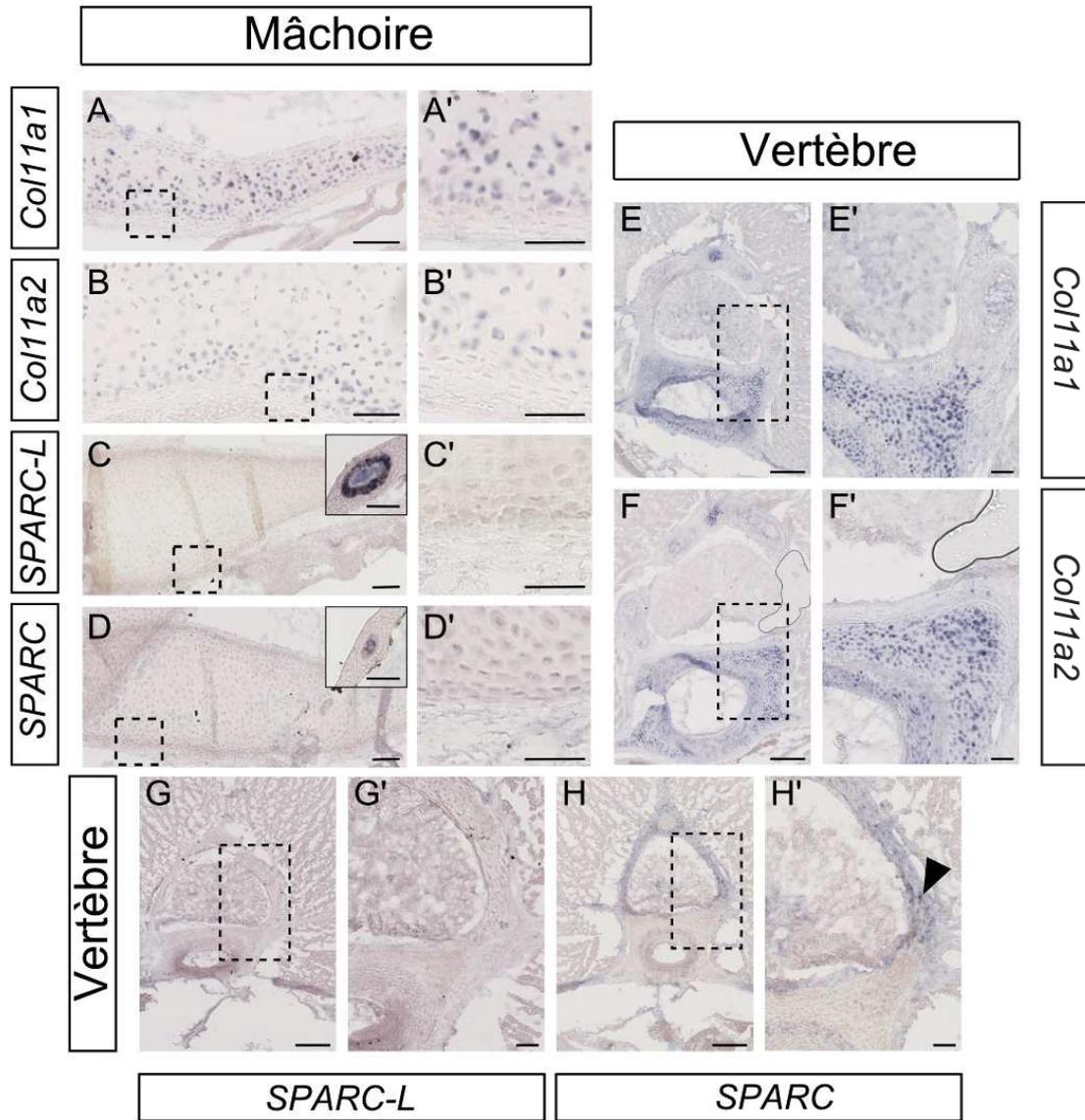


FIGURE 48. – Expression des collagènes de type XI, *SPARC* et *SPARC-Like* dans la mâchoire et les vertèbres de la petite roussette. **A, A'** : patron d'expression de *Col11a1* dans le cartilage de Meckel. **B, B'** : *Col11a2*. **C, C'** : *SPARC-L*. **D, D'** : *SPARC*. **A-D** : Échelles : 100 µm Encarts : 50 µm. **A'-D'** : Échelles : 50 µm. **E, E'** : patron d'expression de *Col11a1* dans les vertèbres. **F, F'** : *Col11a2*. **G, G'** : *SPARC-Like*. **H, H'** : *SPARC*. **E-H** : Échelles : 200 µm. **E'-H'** : Échelles : 50 µm.

21. Approche moléculaire de la squelettogénèse au cours du développement embryonnaire

initialement quant à la séquence de minéralisation de ces pièces et au contexte moléculaire dans lequel celle-ci se produit.

21.2.1. Séquence de minéralisation du squelette de *S. canicula*

Un nombre limité de pièces squelettiques se calcifie au cours du développement embryonnaire : celles-ci incluent une partie du squelette axial (la colonne vertébrale) et le squelette dermique, incluant la dentition et les denticules dermiques. Les premiers éléments à se minéraliser étant les éléments du squelette dermique : la première rangée de dents, les écailles primaires dorsales, et les écailles primaires caudales. Leur séquence de minéralisation reste difficile à établir ici dans la mesure où ces éléments sont déjà bien visibles sur le plus jeune individu scanné au cours de ce travail (figure 38-A). La minéralisation de l'axe vertébral commence peu après et débute par les arcs neuraux, dont la calcification semble se produire très rapidement, suivis par les centres vertébraux, d'abord dans la région thoracique puis enfin dans la région post-pelvienne.

D'autres éléments squelettiques sont toutefois calcifiés au cours de la période post-embryonnaire, pendant la vie de l'animal, en particulier les ceintures et une partie du squelette appendiculaire, ce qui est illustré dans la figure 42.

D'autres éléments de l'axe vertébral sont également calcifiés au cours de la période post-embryonnaire : en particulier une fine bande de cartilage prismatique au sein des arcs hémaux (figure 49-A) et des rayons épicaux et hypocaux de la nageoire caudale (figure 49-B), ce qui est très réminiscent de la calcification des radiaux des nageoires pectorales et des nageoires pelviennes. Les interneuraxiaux ne sont en revanche pas calcifiés. Si le squelette crânien n'a pas été abordé ici, il est néanmoins évident que certains éléments sont également calcifiés au cours de la croissance de l'animal, notamment les cartilages de la mâchoire (palatocarré et cartilage de Meckel), bien visibles sur les scans d'un individu subadulte (figure 41-B).

Les données de microtomographie à rayons-X, de résolution intermédiaire, ne permettent pas d'accéder à la morphologie fine des structures minéralisées. S'il est possible d'utiliser une résolution plus importante (9 μm , les spécimens présentés ici ont été scannés avec une résolution de 18 μm), cette procédure a tendance à générer des fichiers de taille très importante ce qui complique et rallonge considérablement le processus post-acquisition

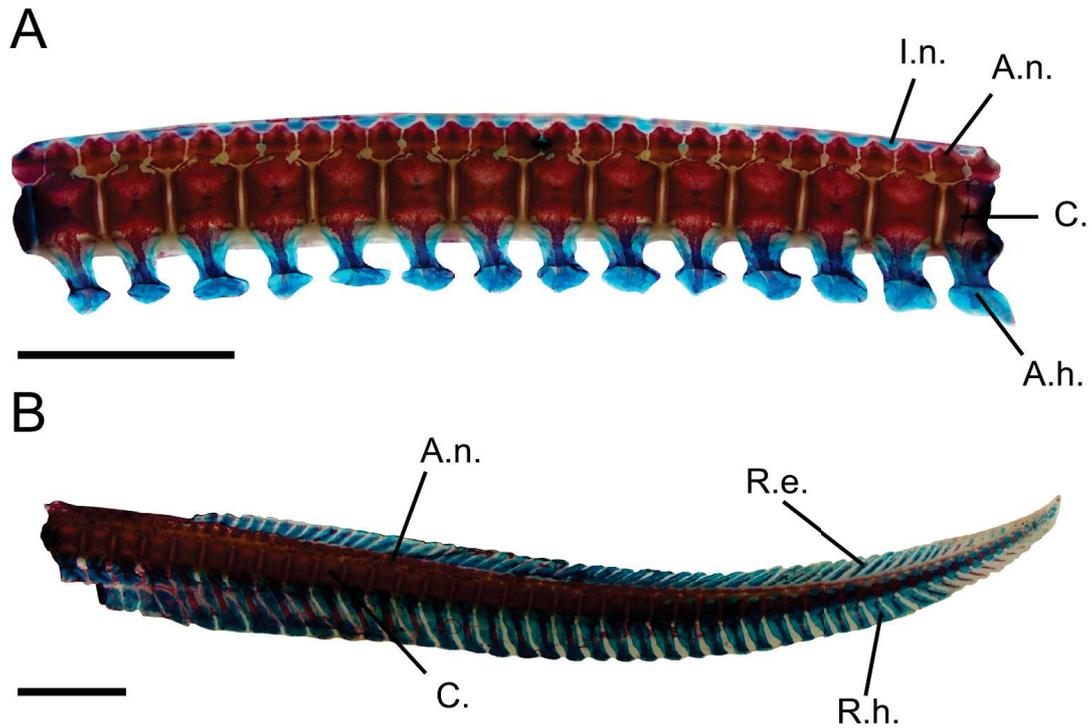


FIGURE 49. – Morphologie squelettique des vertèbres de *S. canicula*, colorées au bleu alcian/rouge d'alizarine. **A** : vertèbres post-pelviennes. **B** : vertèbres caudales. Échelle : 1 cm

(reconstruction 3D, génération des surfaces, etc.). La microtomographie synchrotron, bien que nettement plus coûteuse, permettrait de générer des modèles précis du squelette interne, quel que soit son degré de minéralisation.

Comparé à des approches « classiques » de l'étude de la squelettogénèse (double colorations en particulier) la microtomographie offre toutefois un certain nombre de possibilités qui n'ont pas été exploitées ici, notamment l'accès aux coupes virtuelles et la segmentation des structures internes. L'utilisation d'agents de contraste, tels que l'iode, permettrait théoriquement de visualiser, et donc de reconstruire, les tissus mous ce qui offre des perspectives considérables dans l'exploration de l'anatomie interne des chondrichthyens au cours de l'embryogenèse. Cette approche a cependant donné des résultats peu concluants avec le cartilage. Il faut également souligner que la microtomographie permet de générer des modèles en trois dimensions, manipulables avec des outils en libre accès, ce qui peut à terme permettre de rendre ces reconstructions disponibles pour l'ensemble de la communauté scientifique. L'utilisation combinée de ces techniques peut donc permettre d'envisager la réalisation une table développementale précise de la

21. Approche moléculaire de la squelettogénèse au cours du développement embryonnaire

mise en place et de la séquence de minéralisation des différentes pièces squelettiques au cours du développement embryonnaire et de la croissance de l'animal.

21.2.2. Contexte moléculaire de la calcification des pièces squelettiques

Trois types de calcification distinctes ont pu être mis en évidence chez les embryons de *S. canicula* : i) la calcification prismatique (tesserae) dans le cartilage de Meckel ; ii) un cartilage calcifié autour de la notochorde, et iii) un type de calcification ressemblant à de l'ossification péri-chondrale au niveau des arcs neuraux. Ces types de calcification, bien distincts d'un point de vue morphologique, se produisent de plus dans des contextes moléculaires distincts.

La calcification prismatique a lieu dans un micro-environnement positif en collagènes de type II et XI et négatif en collagènes de type I, caractéristiques du tissu osseux (figure 46-K-M', figure 48-A-C'). Les patrons d'expression de ces gènes ne permettent toutefois pas de différencier les zones de calcification de la matrice cartilagineuse du cartilage de Meckel. Les données d'expression des SPARCs (figure 48-D-E') permettent difficilement d'apporter de nouveaux éléments sur la calcification des tesserae dans la mesure où seul *SPARC* semble transcrit dans l'ensemble des chondrocytes du cartilage de Meckel, bien que le signal d'expression soit assez faible. Des travaux antérieurs indiquent que les tesserae sont en réalité caractérisées par deux types de calcification distincts sur la base de leur histologie : prismatique en surface et globulaire (moins minéralisé et constitué de sphérules d'hydroxyapatite) en profondeur (Dean & Summers, 2006). Ces observations sont probablement réalisées chez des individus adultes, dont l'espèce n'est pas précisée, et les données histologiques obtenues ici (figure 46-J') ne permettent pas d'apporter de nouvelles informations sur ce type de calcification encore mal documenté.

Dans le centre vertébral, une zone de calcification supplémentaire se situe autour du cordon fibreux de la notochorde. Ce type de calcification, bien mis en évidence par les colorations HES et bleu alcian/rouge d'alizarine, se produit en l'absence de transcription de collagène de type I tandis que l'expression des collagènes de type II et XI est réduite. Les gènes *SPARC* et *SPARC-Like* ne sont pas non plus exprimés dans cette zone de calcification. Des résultats extrêmement similaires sont également obtenus dans les vertèbres du xénope (Enault et al., 2015b), et ce à trois niveaux distincts : i) anatomique : ce

21. Approche moléculaire de la squelettogénèse au cours du développement embryonnaire

type de calcification est observé uniquement dans le corps vertébral et dans aucun autre élément squelettique ; ii) histologique : la calcification vertébrale est mise en évidence à la fois par le rouge d'alizarine et par un marquage HES plus intense que le reste de la matrice cartilagineuse ; iii) moléculaire : les collagènes de type I ne sont pas transcrits dans cette zone, et l'expression de *Col2a1*, *Col11a1* et *Col11a2* est y fortement diminuée. Une interprétation possible de ces résultats serait d'envisager la présence d'un cartilage calcifié chez les premiers gnathostomes, qui aurait pu permettre de rigidifier le squelette axial pour la nage dans un environnement marin, cependant trop peu minéralisé pour être retrouvé à l'état fossile.

Enfin, la matrice cartilagineuse des arcs neuraux est recouverte par un périchondre dont la matrice est calcifiée. Cette calcification se produit en l'absence d'expression des collagènes de type II et de type XI, mais *Col1a1* et *Col1a2* sont en revanche transcrits dans les cellules du périchondre (figure 47-H-J'). Les données d'expression sont un peu moins claires dans le cas des SPARCs : s'il est clair que *SPARC-Like* n'est transcrit ni dans les chondrocytes des arcs neuraux ni dans les cellules du périchondre, *SPARC* semble en revanche être exprimé par quelques cellules situées dans le périchondre (figure 48-H', flèche noire).

Ces résultats indiquent clairement que la calcification des pièces squelettiques de *S. canicula*, spécifique d'un point de vue morphologique, se produit également dans des contextes moléculaires distincts. L'obtention de résultats similaires chez d'autres espèces de chondrichthyens pourrait ainsi confirmer que la minéralisation du squelette des poissons cartilagineux est bien plus versatile que chez les ostéichthyens, chez qui elle se produit principalement dans un micro-environnement moléculaire riche en collagène de type I. Ces données ne permettent toutefois pas de statuer avec certitude sur la présence de tissus osseux dans les arcs neuraux de *S. canicula*, tel que suggéré par des travaux antérieurs (PPeignoux-Deville et al., 1982; Peignoux-Deville & Janvier, 1984; Wurmbach, 1932).

21.2.3. Evolution des tissus osseux

La calcification observée au niveau des arcs neuraux implique des cellules exprimant des collagènes de type I et se produit autour d'une matrice cartilagineuse dont les chondro-

21. Approche moléculaire de la squelettogénèse au cours du développement embryonnaire

cytes expriment *Col2a1*, une situation qui est fortement réminiscente de l'ossification péri-chondrale des ostéichthyens. Dans la mesure où le registre fossile indique que la nature cartilagineuse du squelette des chondrichthyens modernes (néosélaciens) constitue un état de caractère dérivé, et que le tissu osseux recouvrant les pièces squelettiques de certaines espèces a été perdu au cours de l'évolution du groupe (Coates et al., 1998; Eames et al., 2007; Long et al., 2015), il n'est pas surprenant que certains auteurs aient proposé que les cellules situées dans le péri-chondre calcifié puissent être des ostéocytes (Peignoux-Deville et al., 1982).

Chez les ostéichthyens, le processus d'ossification implique la transformation des ostéoblastes, cellules responsables de la production de la matrice ostéoïde, en ostéocytes, enfermés à l'intérieur de leur matrice minéralisée (Hall, 2005). Les ostéocytes (figure 50-A) sont notamment caractérisés par une forme en étoile et de nombreux prolongements cytoplasmiques situés au sein d'un réseau complexe de lacunes et de canalicules. Il est difficile d'établir si les ostéocytes décrits par Peignoux-Deville et al., 1982 présentent réellement cette morphologie caractéristique (figure 50-B). Les cellules observées dans les zones de calcification des arcs neuraux de *S. canicula* ne semblent pas insérées dans des lacunes et ne présentent pas de processus cytoplasmiques ni de réseau de canalicules visibles. Cependant, la mauvaise fixation de nos échantillons ne permet pas de localiser clairement les membranes cytoplasmiques. L'étude d'échantillons correctement fixés pour l'observation au MET pourrait donc révéler la présence de lacunes et de prolongements cytoplasmiques dans le péri-chondre des arcs neuraux de la petite roussette. La morphologie générale de ces cellules ressemble pourtant beaucoup à celle des ostéocytes, et s'il reste effectivement difficile de les définir comme tels, leurs similarités moléculaires et morphologiques permettent d'envisager des résultats prometteurs dans la poursuite de l'étude commencée avec ce travail.

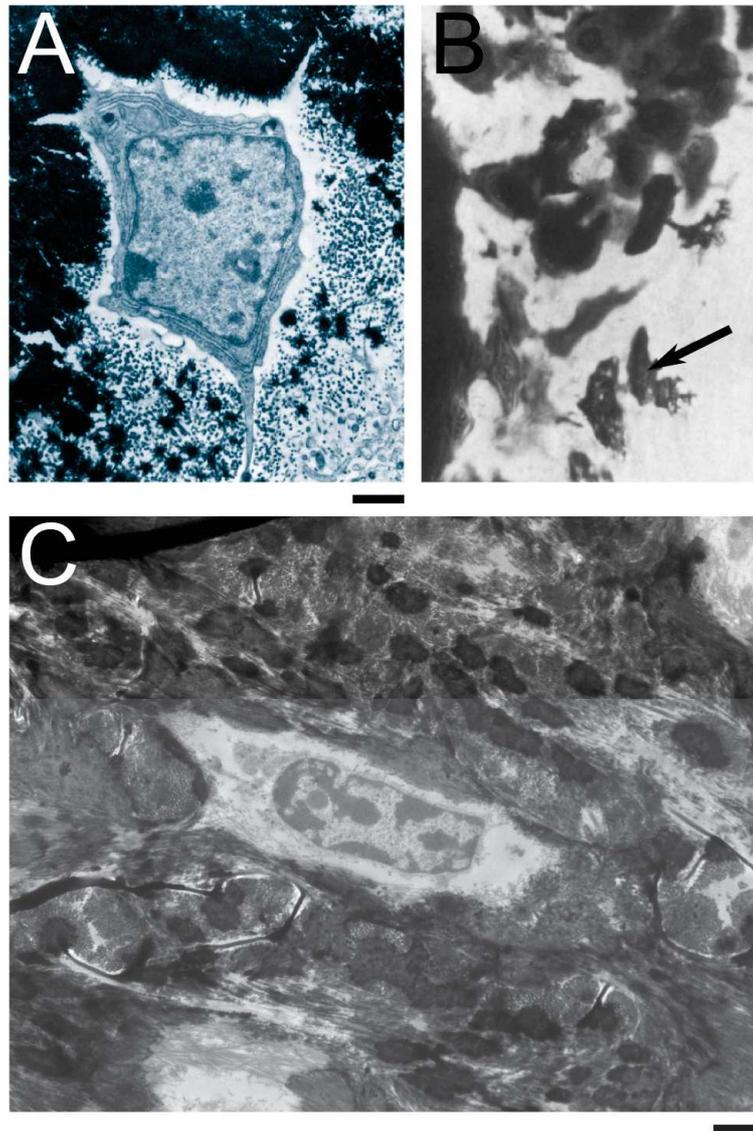


FIGURE 50. – Ostéocyte et cellules des arcs neuraux calcifiés de *S. canicula* en microscopie électronique à transmission. **A** : ostéocyte de poulet, modifié d'après Hall, 2005. Échelle : 1 μm . **B** : fibroblastes et ostéocytes (indiqué par la flèche noire) dans les arcs neuraux calcifiés de la petite roussette. Modifié d'après Peignoux-Deville et al. (1982). Grossissement : $\times 250$. **C** : cellule observée dans la zone calcifiée des arcs neuraux de *S. canicula* au cours de ce travail. Échelle : 1 μm .

22. Publications associées

22.1. Manuscrit 2 : « Skeletogenesis during the late development of the catshark *Scyliorhinus canicula* (Chondrichthyes ; Neoselachii) »

Skeletogenesis during the late development of the catshark
Scyliorhinus canicula (Chondrichthyes ; Neoselachii)

Sebastien Enault, Sylvain Adnet, Mélanie Debiais-Thibaud

Des résultats issus de ce manuscrit ont été présentés au congrès *Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology* (IAFSB) à Tavira, Portugal, en Avril 2015.

1 **Title:** Skeletogenesis during the late embryonic development of the catshark *Scyliorhinus*
2 *canicula* (Chondrichthyes; Neoselachii)

3 **Authors:** Sébastien Enault, Sylvain Adnet, Mélanie Debiais-Thibaud*

4

5 Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier, UMR5554, Université Montpellier,
6 CNRS, IRD, EPHE, c.c.064, place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France

7

8 * Corresponding author: mdebiais@univ-montp2.fr

9 Adress Institut des sciences de l'évolution de Montpellier (ISE-M), Université Montpellier 2 -
10 UMR 5554, Place Eugène Bataillon C.C. 064, 34095 Montpellier cedex 05 France

11 Phone +33 4 67 14 46 52

12 Fax +33 4 67 14 36 10

13

14 **Running title:** Skeletal development in the catshark

15

16

17

1 **Abstract:**

2 Current knowledge on the skeletogenesis of cartilaginous fish is scarce compared with their
3 sister group, the bony fishes, and most developmental works focus on external morphology
4 only. Due to its small body size and relative simplicity to raise eggs in laboratory conditions,
5 the catshark *Scyliorhinus canicula* is currently being considered as the best model organism to
6 describe developmental mechanisms in the chondrichthyan lineage. Here we investigate the
7 dynamic of mineralization in six embryonic specimens using X-ray microtomography and
8 describe both units of the endoskeleton (vertebral axis) and dermal skeleton (teeth and dermal
9 scales). This preliminary data on skeletogenesis in cartilaginous fishes should provide
10 comparison points with data known in osteichthyans and could thus be used in the broader
11 context of gnathostome skeletal evolution.

12

13

14 **Keywords:** chondrichthyan, skeleton, cartilage, development, mineralization

15

16

17

1

TECHNICAL AND SPECIMEN-RELATED PARAMETERS

Species	<i>Scyliorhinus canicula</i>	<i>Scyliorhinus canicula</i>	<i>Scyliorhinus canicula</i>	<i>Scyliorhinus canicula</i>	<i>Scyliorhinus canicula</i>	<i>Scyliorhinus canicula</i>
Specimen number	A completer	A completer	A completer	A completer	A completer	A completer
Repository institution	Université de Montpellier, France	Université de Montpellier, France	Université de Montpellier, France	Université de Montpellier, France	Université de Montpellier, France	Université de Montpellier, France
CT scanner institution	Université de Montpellier, France	Université de Montpellier, France	Université de Montpellier, France	Université de Montpellier, France	Université de Montpellier, France	Université de Montpellier, France
(CT) scanner model	Skyscan-1076	Skyscan-1076	Skyscan-1076	Skyscan-1076	Skyscan-1076	Skyscan-1076
(CT) scanner operator	S. Enault	S. Enault	S. Enault	S. Enault	S. Enault	S. Enault
Voxel size of original 3D dataset in mm	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018
Number of slices	3341	3544	3848	4055	4312	2475
Slices dimensions	640x536	644x452	560x396	860x492	640x488	500x500
Author of 3D model	M. Debiais-Thibaud	M. Debiais-Thibaud	M. Debiais-Thibaud	M. Debiais-Thibaud	M. Debiais-Thibaud	M. Debiais-Thibaud
Model ID number	will be retrieved during the submission process	will be retrieved during the submission process	will be retrieved during the submission process	will be retrieved during the submission process	will be retrieved during the submission process	will be retrieved during the submission process
Model short description	Mineralized skeleton of a 6,2cm catshark embryo	Mineralized skeleton of a 6,7cm catshark embryo	Mineralized skeleton of a 7,1 cm catshark embryo	Mineralized skeleton of a 7,5cm catshark embryo	Mineralized skeleton of a 8cm catshark embryo	Mineralized skeleton of a 10cm catshark embryo

2

3

METHODS

4 Embryos used for this study were obtained at the Station Marine de l'Environnement Littoral
5 (SMEL, Sète, France) and were laid by females from a Mediterranean population fished in
6 central Gulf of Lion (N43°- 43°.30' E4°- 4°.30'). Eggs were raised in the lab at 18°C until
7 proper developmental stages were reached. Scanned specimens were first visualized using
8 AVIZO 6.3 (Visualization Sciences Group). Surface models were exported and colored and

1 labelled in Meshlab, and the 3D models are provided in .ply format. Terminology for
2 morphological structures mostly follows Compagno (1999).

3 INTRODUCTION

4 Due to their complex reproductive biology and to the difficulty to raise most species in
5 laboratory conditions, the embryonic development of chondrichthyan (sharks, skates, rays and
6 chimaeras) remains poorly known when compared to their sister group, the osteichthyans.
7 Among the handful of species currently being used for developmental studies, the lesser
8 spotted catshark *Scyliorhinus canicula* (Linnaeus, 1758) is being considered as the best model
9 organism to describe developmental mechanisms in the chondrichthyan lineage (Godard &
10 Mazan, 2013). This small shark is abundant in the eastern Atlantic Ocean and Mediterranean
11 Sea and its size and reproductive behavior make it an ideal species to address developmental
12 questions. The reference work on this species was done by Ballard et al. (1993) who
13 published a developmental table focusing on the description of all embryonic developmental
14 stages. However, they only describe external morphology and neglected the cartilaginous
15 endoskeleton, one of the defining and most prominent characteristics of chondrichthyan
16 anatomy. Most of our current knowledge on chondrichthyan skeletogenesis is therefore based
17 on 19th and 20th century descriptions and is usually based on an admixture of several species
18 and mostly focusing on the skull (e.g. de Beer, 1931; Holmgren, 1940; Gegenbaur, 1872).
19 However, the current renewal in comparative developmental approaches in evolutionary
20 biology led to recent studies of skeletogenesis in chondrichthyans ((Dahn et al. 2007;
21 D'Souza et al. 2013; Compagnucci et al. 2013; Eames et al. 2007; O'Shaughnessy, Dahn, and
22 Cohn 2015) and the necessity for full developmental tables including skeletogenesis is
23 particularly strong in this group.

1 Here we investigate skeletal mineralization during the embryonic development in the small-
2 spotted catshark using X-ray microtomography. We describe successive steps of skeletal
3 development in six embryos ranging from six centimeters long to ten centimeters long (which
4 roughly corresponds to hatching size). This period in embryonic development correspond to
5 stages 32/33 in Ballard et al. (1993) and lasts about half of the total time of embryogenesis (5-
6 11 months depending on temperature ((Ellis & Shackley 1997))). Our data focus on the axial
7 skeleton (endoskeleton) and the teeth and dermal denticles (dermal skeleton) and allow the
8 description of the temporal stages of skeletal calcification only by X-ray microtomography.

9 **DESCRIPTION**

10 **Axial skeleton/Vertebral axis**

11 Vertebrae are not calcified on the first embryo examined (6.2 cm, Figure 1A). The only
12 calcified elements are the primary dorsal scales. The 6.7 cm embryo (Figure 1B) exhibits
13 mineralized neural arches, and very poor centrum calcification. Most neural arches appear to
14 be present (n=181 on a 205 total on the 10 cm embryo) except for those closest to the tip of
15 the tail. At 7.1 cm however (Figure 1C), centrum calcification appears to be well under way in
16 the thoracic region. The 7.5 cm embryo exhibits more pronounced centrum calcification in the
17 thoracic region while the centra in the post-pelvic region start to calcify as well (37 thoracic
18 centrum and 69 post-pelvic centra, the last ones being very poorly mineralized) (Figure 1D).
19 The 8 and 10 cm embryos (Figure 1E-F) exhibit the same pattern of calcification (see also
20 Eames et al. (2007)). The centra are more calcified until they join, especially in the thoracic
21 region. The last caudal centra and neural arches are still too poorly calcified at this stage to be
22 reconstructed on the models.

23 **Teeth**

1 The first teeth are already mineralized in the 6,2 cm embryo (Debiais-Thibaud et al. 2011).
2 They start to develop on the side of the jaws, following a rostro-caudal axis. The symphyseal
3 teeth are not mineralized in the first stage investigated (Figure 2A). The symphyseal tooth
4 files appear in the 6,-7 and 7-cm long embryos (Figure 2B-C). In the three first specimens,
5 only a single row of teeth is present. In the 7,-5 cm embryo, the symphyseal family is fully
6 mineralized and a second row of teeth is added. Teeth are organized in staggered rows. A
7 third row of teeth is then added in the 8 and 10 cm embryos investigated here. Tooth
8 morphology appears very simple, without any obvious accessory cusps, but Debiais-Thibaud
9 et al. (2011) showed that small lateral cusps are present but probably not detectable at this
10 scanning resolution.

11 **Dermal denticles**

12 ***Primary caudal scales (PCS).***

13 The primary caudal scales are the first to appear during the catshark embryonic development,
14 and this occurs prior to the stages investigated here (Debiais-Thibaud *et al.*, 2011; Mellinger
15 & Wriesez ,1993). They form two bilateral rows on each side of the tip of the caudal fin. In the
16 first stage investigated, there is the same number of scales in the dorsal and ventral rows
17 (Figure 3A). In the 6, 7 cm embryo (Figure 3B), the dorsal row already possess more scales
18 than the ventral row, a situation which is maintained in all older specimens (Figure 3C-F).
19 The primary caudal scales exhibit a rather simple morphology, with a flat crown surface, a
20 broad peduncle and an overall radial symmetry. They develop following a posterior-anterior
21 axis and are lost soon after hatching.

22 ***Primary dorsal scales (PDS).***

1 The small-spotted catshark embryos exhibit two rows of large dermal denticles on the dorsal
2 surface, starting after the last gill slit and ending before the first dorsal fin (Mellinger &
3 Wisez, 1993). The two rows of PDS are symmetrical: they exhibit the same number of scales
4 on each side. There appears to be variation in their number: between 27 and 31 PDS per row
5 depending on the embryo. In the first stages studied here, they are very simple in shape, with
6 flat crown, and lengthened following an anterior-posterior axis (Figure 3 A-C'). In the later
7 stages investigated, their morphology is more complex, the flat crown has straightened
8 resulting in a cusped appearance of the denticle crown, and they exhibit a broad, radiating
9 peduncle (Figure 3D-F'). Change in the morphology of the PDS is probably linked to the
10 timing of their eruption and the process of calcification.

11 *Body-covering dermal denticles.*

12 In addition to the PDS and PCS the small-spotted cartshark is covered in minute placoid
13 scales which form a rather homogeneous body covering in the adult. These dermal denticles
14 exhibit a very simple morphology and were first detected in the 7 cm embryo (Figure 4A,
15 arrows). These first dermal denticles are seen first in the caudal region, just behind the PDS
16 although there is some overlap. In the 7, 5 cm long embryo, dermal placoid scales cover more
17 areas of the body, most notably the snout (Figure 4B). The last two stages investigated, 8 and
18 10 cm, exhibit a very similar pattern of squamation, with the dermal placoid scales covering
19 the belly and fin margins in addition to the areas described in younger embryos. At all
20 investigated stages, body dermal scales never exhibit the same morphology as the primary
21 dorsal or caudal scales, as they are formed of a single small cusp.

22

DISCUSSION

23 X-ray microtomography allows for the detection and description of well calcified units of the
24 endo- and dermal skeleton. This work provides preliminary data on the skeletal development

1 in *Scyliorhinus canicula* and is intended as a first step in the construction of an extensive and
 2 updated developmental table focusing on the development of the skeleton in this species,
 3 using dissection, X-ray microtomography and double staining procedures.

4 This preliminary data on skeletogenesis in cartilaginous fishes should provide comparison
 5 points with data known in osteichthyans and thus could be used in the broader context of
 6 gnathostome skeletal evolution. We hope this tool will be useful for the community of
 7 researchers involved in skeletal evolution in cartilaginous fish and gnathostomes in general by
 8 providing comparative data with osteichthyans.

9 **ACKNOWLEDGEMENTS**

10 We thank M. Burette, M. Taleb, P.A. Vernet and M. Buysse for their help with data
 11 acquisition. Biological materials and breeding tank sets are co-financed by ISEM, ANR
 12 ECODEV (N°13-BSV7-0005) and PEPS ExoMod. This is ISEM publication 2015-X

13 **REFERENCES**

- 14 Ballard, W., Mellinger J., Lechenault, H., 1993. “A series of normal stages for development
 15 of *Scyliorhinus canicula*, the lesser spotted dogfish (Chondrichthyes, Scyliorhinidae).”
 16 *Journal of Experimental Zoology* 267, 318–336. doi:10.1002/jez.1402670309.
- 17 Compagno, L. J. V. , 1999. Endoskeleton. In: Hamlett, W.C. (Ed.), *Sharks, Skates and Rays.*
 18 *The Biology of Elasmobranch Fishes.* Johns Hopkins University Press, pp. 69-92.
- 19 Compagnucci, C., Debiais-Thibaud, M., Coolen, M., Fish, J., Griffin, J.N., Bertocchini, F.,
 20 Minoux, M., Rijli, F.M., Borday-Birraux, V., Casane, D., Mazan, S., Depew, M., 2013.
 21 Pattern and polarity in the development and evolution of the gnathostome jaw: both
 22 conservation and heterotopy in the branchial arches of the shark, *Scyliorhinus canicula*.
 23 *Developmental Biology* 377, 428–48. doi:10.1016/j.ydbio.2013.02.022.
 24 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23473983>.
- 25 D’Souza, D. G., Rana, K., Milley, K.M., MacLean, H.E., Zajac, J.D., Bell, J., Brenner, S.,
 26 Venkatesh, B., Richardson, S.J., Danks, J.A., 2013. Expression of Wnt signaling Skeletal
 27 development genes in the cartilaginous fish, elephant shark (*Callorhynchus milii*).
 28 *General and Comparative Endocrinology* 193, 1–9. doi:10.1016/j.ygcen.2013.06.021.
 29 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.06.021>.

- 1 Dahn, Randall D, Marcus C Davis, William N Pappano, and Neil H Shubin. 2007. “Sonic
2 Hedgehog Function in Chondrichthyan Fins and the Evolution of Appendage
3 Patterning.” *Nature* 445 (7125): 311–314. doi:10.1038/nature05436.
- 4 De Beer, G.R., 1931. The Development of the skull of Scyllium (*Scyliorhinus*) canicula L.
5 *Quarterly Journal of Microscopical Science* 74, 591–652.
- 6 Debiais-Thibaud, M., Oulion, S., Bourrat F., Laurenti, P., Casane, D., Borday-Birraux, V.,
7 2011. The homology of odontodes in gnathostomes: insights from *Dlx* gene expression
8 in the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. *BMC Evolutionary Biology* 11, 307.
9 doi:10.1186/1471-2148-11-307.
- 10 Eames, B. F., Allen, N., Young, J., Kaplan, A., Helms J.A., Schneider, R.A., 2007.
11 Skeletogenesis in the swell shark *Cephaloscyllium ventriosum*. *Journal of Anatomy* 210,
12 542–54. doi:10.1111/j.1469-7580.2007.00723.x.
- 13 Ellis, J.R., Shackley, S.E., 1997. The reproductive biology of *Scyliorhinus canicula* in the
14 Bristol Channel, U.K. *Journal of Fish Biology*, 361-372. doi:10.1111/j.1095-
15 8649.1997.tb01672.x.
- 16 Gegenbaur, C., 1872. Das kopfskelet der selachier, ein beitrage zur erkenntniss der genese des
17 kopfskelete der wirbelthiere. In: Engelmann, W. (Ed.), *Untersuchungen Zur*
18 *Vergleichenden Anatomie Der Wirbelthiere*. Drittes Heft. Leipzig.
- 19 Godard, B. G., Mazan, S., 2013. Early patterning in a chondrichthyan model, the small
20 spotted dogfish: towards the gnathostome ancestral state. *Journal of Anatomy* 222, 56–
21 66. doi:10.1111/j.1469-7580.2012.01552.x.
- 22 Holmgren, N., 1940. Studies of the Head in Fishes. Part 1. Development of the Skull in
23 Sharks and Rays. *Acta Zoologica* 21, 51–257.
- 24 Lebrun, R., 2014. ISE-MeshTools, a 3D Interactive Fossil Reconstruction Freeware. In: 12th
25 Annual Meeting of EAAP, Torino, Italy.
- 26 Mellinger, J., Wriesez, F., 1993. Etude des ecailles primaires de l’embryon de la roussette
27 *Scyliorhinus canicula* (Chondrichthyes, Scyliorhinidae) au microscope electronique à
28 balayage. *Annales des sciences naturelles, zoologie*, 13ème Série 14, 13–22.
- 29 O’Shaughnessy, K. L., Dahn, R.D., Cohn, M.J, 2015. Molecular development of
30 chondrichthyan claspers and the evolution of copulatory organs. *Nature Communications*
31 6, 6698. doi:10.1038/ncomms7698.

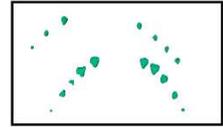
32

33 **FIGURES**

A



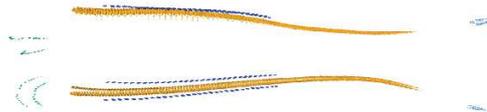
A'



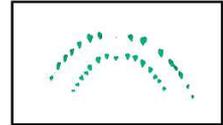
A''



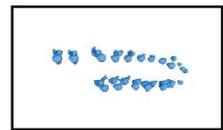
B



B'



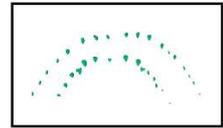
B''



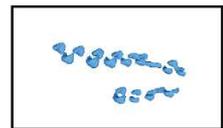
C



C'



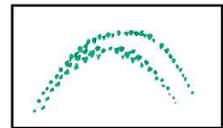
C''



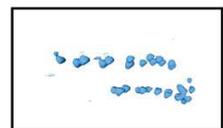
D



D'



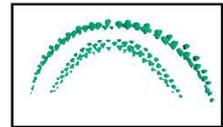
D''



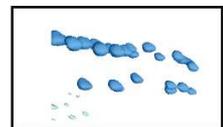
E



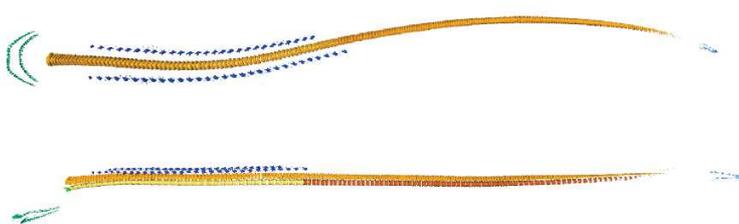
E'



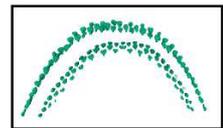
E''



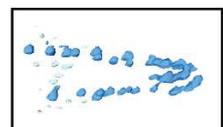
F



F'



F''



1 Figure 1: 3D models of the axial skeleton in embryonic *Scyliorhinus canicula* in dorsal and
 2 lateral view. **A:** 6, 2 cm; **B:** 6, 7 cm; **C:** 7, 1 cm; **D:** 7, 5 cm; **E:** 8 cm; **F:** 10 cm; scale bar:
 3 1cm. For each specimen separate panels shows a dorsal close up on the dentition (box with ')
 4 and a lateral close up on the primary caudal scales (box with '').
 5



6
 7 Figure 2: Dermal placoid scales and denticles of the embryonic *Scyliorhinus canicula*, dorsal
 8 view. **A:** 7 cm; **B:** 7, 5 cm; **C:** 8 cm; **D:** 10 cm; **E:** 8 cm; **F:** 10 cm. Scale: 1cm

22.2. Publication 3 : « Molecular footprinting of skeletal tissues in the catshark *Scyliorhinus canicula* and the clawed frog *Xenopus tropicalis* identifies conserved and derived features of vertebrate calcification »

Molecular footprinting of skeletal tissues in the catshark *Scyliorhinus canicula* and the clawed frog *Xenopus tropicalis* identifies conserved and derived features of vertebrate calcification

Sebastien Enault, David Muñoz, Willian Silva, Véronique Borday-Birraux, Silvan Oulion, Stéphanie Ventéo, Sylvain Marcellini, Mélanie Debiais-Thibaud

Frontiers in Genetics

Volume 6 : 238

Des résultats issus de ce manuscrit ont été présentés aux congrès *Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology* (IAFSB) à Tavira, Portugal, en Avril 2015 et au congrès *Symposium on Early and Lower Vertebrates*, à Melbourne, Australie, en Aout 2015.



OPEN ACCESS

Edited by:

Naiara Rodríguez-Ezpeleta,
AZTI-Tecnalia, Spain

Reviewed by:

Ingo Braasch,
University of Oregon, USA
Brian Frank Eames,
University of Saskatchewan, Canada

***Correspondence:**

Sylvain Marcellini,
Department of Cell Biology, Faculty of
Biological Sciences, Universidad de
Concepción, Barrio Universitario s/n,
Casilla 160-C, Concepción, Chile
smarcellini@udec.cl;
Mélanie Debiais-Thibaud,
Institut des Sciences de l'Évolution de
Montpellier, UMR5554, Université
Montpellier, Centre National de la
Recherche Scientifique, IRD, EPHE,
Eugène Bataillon, cc064 - 34000
Montpellier, France
mdebiais@univ-montp2.fr

† Present Address:

William T. A. F. Silva,
Department of Ecology and
Genetics/Evolutionary Biology,
Evolutionary Biology Center, Uppsala
University, Uppsala, Sweden

‡ Co-first authors.

Specialty section:

This article was submitted to
Evolutionary and Population Genetics,
a section of the journal
Frontiers in Genetics

Received: 30 April 2015

Accepted: 24 August 2015

Published: 15 September 2015

Citation:

Enault S, Muñoz DN, Silva WTAF,
Borday-Birraux V, Bonade M,
Oulion S, Ventéo S, Marcellini S and
Debiais-Thibaud M (2015) Molecular
footprinting of skeletal tissues in the
catshark *Scyliorhinus canicula* and the
clawed frog *Xenopus tropicalis*
identifies conserved and derived
features of vertebrate calcification.
Front. Genet. 6:283.
doi: 10.3389/fgene.2015.00283

Molecular footprinting of skeletal tissues in the catshark *Scyliorhinus canicula* and the clawed frog *Xenopus tropicalis* identifies conserved and derived features of vertebrate calcification

Sébastien Enault^{1‡}, David N. Muñoz^{2‡}, William T. A. F. Silva^{1†}, Véronique Borday-Birraux^{3,4}, Morgane Bonade³, Silvan Oulion¹, Stéphanie Ventéo⁵, Sylvain Marcellini^{2*} and Mélanie Debiais-Thibaud^{1*}

¹ Institut des Sciences de l'Évolution de Montpellier, UMR5554, Université Montpellier, Centre National de la Recherche Scientifique, IRD, EPHE, Montpellier, France, ² Laboratory of Development and Evolution, Department of Cell Biology, Faculty of Biological Sciences, Universidad de Concepción, Concepción, Chile, ³ Laboratoire EGCE UMR Centre National de la Recherche Scientifique 9191, IRD247, Université Paris Sud, Gif-sur-Yvette, France, ⁴ Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, ⁵ Institute for Neurosciences of Montpellier, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1051, Montpellier, France

Understanding the evolutionary emergence and subsequent diversification of the vertebrate skeleton requires a comprehensive view of the diverse skeletal cell types found in distinct developmental contexts, tissues, and species. To date, our knowledge of the molecular nature of the shark calcified extracellular matrix, and its relationships with osteichthyan skeletal tissues, remain scarce. Here, based on specific combinations of expression patterns of the *Col1a1*, *Col1a2*, and *Col2a1* fibrillar collagen genes, we compare the molecular footprint of endoskeletal elements from the chondrichthyan *Scyliorhinus canicula* and the tetrapod *Xenopus tropicalis*. We find that, depending on the anatomical location, *Scyliorhinus* skeletal calcification is associated to cell types expressing different subsets of fibrillar collagen genes, such as high levels of *Col1a1* and *Col1a2* in the neural arches, high levels of *Col2a1* in the tesserae, or associated to a drastic *Col2a1* downregulation in the centrum. We detect low *Col2a1* levels in *Xenopus* osteoblasts, thereby revealing that the osteoblastic expression of this gene was significantly reduced in the tetrapod lineage. Finally, we uncover a striking parallel, from a molecular and histological perspective, between the vertebral cartilage calcification of both species and discuss the evolutionary origin of endochondral ossification.

Keywords: fibrillar collagens, vertebrate skeletogenesis, bone, cartilage, *Scyliorhinus canicula*, *Xenopus tropicalis*

Introduction

The evolutionary origin and diversification of the skeleton remains one of the most intriguing issue in vertebrate biology. Solving this problem requires a comprehensive view of the diversity of skeletal cell types found in distinct developmental contexts, tissues, anatomical locations, and

species, as has been emphasized in a recent synthesis of existing skeletal terminologies (Dahdul et al., 2012). In mammals, the chondrocytes produce the extracellular matrix of the fibrous, elastic and hyaline cartilage, while osteoblasts and osteocytes are involved in bone formation (Benjamin and Evans, 1990; Hartmann, 2009; Zhang et al., 2009; Long, 2011). Yet, an intermediate type of chondroid bone, exhibiting characteristics of both bone and cartilage, has been described in rodents as well as teleosts, leading some authors to propose that, in fact, bone and cartilage represent two extreme forms of a skeletal tissue continuum (Huysseune and Verraes, 1986; Huysseune and Sire, 1990; Mizoguchi et al., 1997; Kranenbarg et al., 2005; Estêvão et al., 2011). In addition, chondrichthyans display a series of heavily calcified skeletal tissues such as the cartilaginous tesseræ of the jaws (with no obvious homologs in osteichthyans, see Dean et al., 2005; Dean and Summers, 2006; Dean et al., 2009; Omelon et al., 2014), the vertebral body developing around the notochord (Peignoux-Deville et al., 1982; Dean and Summers, 2006; Eames et al., 2007; Porter et al., 2007; Fleming et al., 2015) and the perichondrium of the neural arches laying on each side of the neural tube (Peignoux-Deville et al., 1982; Eames et al., 2007). In summary, while developmental and paleontological studies have revealed the versatile nature of skeletal tissues characterizing the vertebrate skeleton (Donoghue and Sansom, 2002; Janvier and Arsénault, 2002; Dahdul et al., 2012; Janvier, 2015), the molecular identity and the evolutionary relationships of the distinct vertebrate skeletal cell types remain an open question.

The comparison of expression patterns represents a powerful approach to examine cell type evolution and, for instance, has shed light on the origin of sensory neurons in animals (Arendt, 2008). Here, we have explored the possibility that combinations of expression patterns of genes coding for crucial components of the skeletal matrix can serve as useful molecular footprints to compare the identity of skeletal cell types between chondrichthyan and osteichthyan representatives. We chose to focus on the *Col1a1*, *Col1a2*, and *Col2a1* genes, belonging to the Clade A of the fibrillar collagen family, because they are known to contribute to biomineralization and because they are intimately associated to skeletal development and evolution (Wada et al., 2006; Rychel and Swalla, 2007; Zhang and Cohn, 2008; Landis and Silver, 2009; Eyre and Weis, 2013; Weis and Dorvee, 2013). *Col1a1* and *Col1a2* (Type I collagen) are robustly expressed in osteichthyan osteoblasts (Kobayashi and Kronenberg, 2005; Li et al., 2009; Albertson et al., 2010; Estêvão et al., 2011; Eames et al., 2012). By contrast, the osteoblastic expression of *Col2a1* (Type II collagen) is more variable and has been reported in developing bones of gar and teleosts (Benjamin and Ralphs, 1991; Albertson et al., 2010; Eames et al., 2012), at low levels in some scattered mouse osteoblasts (Hilton et al., 2007), and transiently in chick preosteoblasts (Abzhanov et al., 2007). In addition, *Col2a1* displays a conserved expression pattern in chondrocytes of immature hyaline cartilage whose proliferation drives the growth of endochondral bones (Benjamin and Ralphs, 1991; Nah et al., 2001; Kerney and Hanken, 2008; Hartmann, 2009; Albertson et al., 2010; Estêvão et al., 2011; Eames et al., 2012). *Col2a1* expression becomes progressively downregulated as the hyaline cartilage matures and calcifies its extracellular matrix

(Eames et al., 2003; Hartmann, 2009). Of particular relevance for this study, *Col2a1*-negative mature cartilage calcification usually occurs at levels that are too weak to robustly stain with Alizarin red, a reagent commonly used to specifically detect the calcifying bone matrix of vertebrate embryos (Kirsch et al., 1997; Khanarian et al., 2014), with some exceptions reported in the swell shark vertebrae and the domestic fowl trachea (Hogg, 1982; Eames et al., 2007). Possibly due to lineage-specific duplications, lamprey and hagfish (cyclostomes) exhibit one or two *Col2a1* orthologs (and no *Col1a1* or *Col1a2* genes) expressed in broad regions encompassing mesenchymal cells and some, but not all, cartilaginous elements (Zhang and Cohn, 2006, 2008; Zhang et al., 2006; Ota and Kuratani, 2010; Cattell et al., 2011). In shark, immunohistochemistry allowed the clear detection of Type II collagen fibers in cartilage matrix, while the weaker reactivity of the anti-Type I collagen antibody suggested a perichondral expression, without allowing the discrimination of cells secreting *Col1a1* and/or *Col1a2* proteins (Eames et al., 2007).

In order to identify skeletal cell types sharing a specific molecular identity between remotely related jawed vertebrates, we compared the endoskeletal expression patterns of the *Col1a1*, *Col1a2*, and *Col2a1* fibrillar collagen genes in the chondrichthyan *Scyliorhinus canicula* (S.c.) and the tetrapod *Xenopus tropicalis* (X.t.). We find that, depending on the anatomical location, skeletal calcification in S.c. occurs in the vicinity of cell types expressing distinct combinations of fibrillar collagen genes. In particular, calcification is associated to perichondral cells expressing high levels of *Col1a1* and *Col1a2* in the neural arches, and to chondrocytes expressing high levels of *Col2a1* in the tesseræ or experiencing a drastic *Col2a1* downregulation in the centrum. In X.t., the moderate expression of *Col2a1* in some osteoblasts differs from the situation described in actinopterygians and amniotes, suggesting that the osteoblastic expression of this gene was significantly reduced in the tetrapod lineage. Finally, we observe a striking parallel between the internal calcification of the vertebral cartilage of X.t. and S.c. and discuss the evolutionary origins of endochondral ossification.

Materials and Methods

Scyliorhinus canicula Biological Material

Scyliorhinus canicula embryos were obtained at the Station Méditerranéenne de l'Environnement Littoral (SMEL, Sète, France) and raised in the laboratory at 18°C. Embryos were euthanized by overdose of MS-222 (Sigma) following all animal-care specifications of the European ethics legislation. Whole embryos were fixed 48 h in PFA 4% in PBS 1× at 4°C and then transferred in ethanol at −20°C for storage. Dissected body parts (jaws or trunk sections) were rehydrated and transferred to a 25% sucrose bath for cryosection at 14 μm thickness, and stored at −20°C on alternative slides to get comparable sections on each slide. These sections were used for *in situ* hybridizations and Alizarin red—Alcian blue histological staining (see following sections). Dissected body parts were decalcified in MORSE (sodium citrate 10% and formic acid 20%) solution for 5 days before being transferred to paraplast blocs and sectioned at 10 μm thickness.

These sections were used for Hematoxylin-Eosin-Safran (HES) histological staining and anti-Col2 immunofluorescence. To perform immunofluorescence, dissected trunk slices from 6.7 cm-long embryos and dissected jaw from 9 cm-long embryo were demineralized for 3 h in MORSE solution at room temperature prior to dehydration, embedded in paraplast and cut at 10–12 μm thickness.

Histological and Immunological Stainings

The same histological procedures were performed for the catshark and clawed frog samples. Histological Alizarin red/Alcian blue double staining was performed by rehydrating samples 1 min in phosphate-buffered saline (PBS) 1X, incubating 30 s in a 0.005% Alizarin red S solution (in KOH 0.5%), washing once with PBS 1X, incubating for 2 min in a 0.02% Alcian blue 8G in solution (in 8:2 ethanol/glacial acid acetic), and washing once in EtOH 100% and once in PBS 1X. The slides were then mounted in mowiol. Hematoxylin-Eosin-Safran (HES) histological staining was performed following standard protocols. Col2 immunofluorescence was performed using a 1/200 dilution of a primary anti-collagen II (II-II6B3; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA) and a 1/1500 dilution of a secondary Goat polyclonal anti-Mouse IgG—AlexaFluor 594 (Abcam ab150116). For epitope retrieval, sections were treated with trypsin 0.05% (Sigma) in 0.1% CaCl₂ buffer at pH7.8 buffer during 10 min at 37°C. Cell nuclei were counterstained with Hoechst.

Scyliorhinus canicula Collagen Clones

Plasmids containing partial or complete collagen cDNA sequences were obtained through screening of a cDNA library of embryo RNA extracts (Oulion et al., 2010). Specific clones were identified by BLAST as *Scyliorhinus canicula* (Sc-) *Collagen1a1* gene (Sc-*Col1a1*, NCBI accession numbers EU241868.1 and KT261785), *Collagen1a2* gene (Sc-*Col1a2*, NCBI accession numbers EU241869.1 and KT261784), and *Collagen2a1* gene (Sc-*Col2a1*, NCBI accession number EU241867.1). The sequences and details of the clones are provided in the **Data Sheet 1**. The phylogenetic relationships between proteic sequences were inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Le_Gascuel_2008 model (Le and Gascuel, 2008). Initial tree(s) for the heuristic search were obtained by applying the Neighbor-Joining method to a matrix of pairwise distances estimated using a JTT model. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites [4 categories (+G, parameter = 0.7935)]. The analysis involved 16 amino acid sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 544 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6 (Tamura et al., 2013).

Scyliorhinus canicula and Xenopus tropicalis Probes

PCR products from specific amplification on Sc-*Col1a2* and Sc-*Col2a1* cDNA inserts were ligated into the pGEM-Teasy vector using the TA cloning kit (Promega). Sc-*Col1a1* was directly amplified from the original cDNA clone. *Xenopus tropicalis* (Xt-)

Xt-*Col1a1* (NM_001011005.1), Xt-*Col1a2* (NM_001079250.1), and Xt-*Col2a1* (NM_203889) were amplified from stage NF60 hindlimb cDNA containing both bone and cartilage and blunt-cloned into the pBluescript vector. The PCR primers used in this study are given in **Supplementary Table 1**. Antisense DIG riboprobes were synthesized using the DIG RNA labeling mix (Roche) and the T3, T7 or Sp6 RNA polymerase (Promega) following the manufacturer's instructions. DIG-labeled riboprobes were purified on MicroSpin G50 column (GE Healthcare).

In situ Hybridization on Scyliorhinus canicula Sections

DIG-labeled probes were hybridized at 70°C overnight, sections were washed twice in 50% formamide, 1× SSC, 0.1% Tween-20 for 1 h at 70°C, twice in MABT buffer for 30 min before blocking in blocking buffer (MABT, 2% blocking reagent from Roche, 20% inactivated sheep serum) for 2 h at room temperature. Sections were then exposed overnight to a 1:2000 dilution of anti-DIG-AP conjugate antibody (Roche) at 4°C. After washing, slides were incubated with NBT-BCIP (Roche) staining solution according to the manufacturer's instructions and the reaction stopped by washing in water. Images of *in situ* hybridizations and histological stainings were taken under a Hamamatsu NanoZoomer 2.0-HT Slide Scanner (40× objective). Sense probe negative *in situ* hybridization results are shown in **Data Sheet 2**.

Xenopus tropicalis Animal Care and In situ Hybridization Procedure

Adult frogs are routinely maintained at the University of Concepcion following standard protocols established for *Xenopus tropicalis*. Embryos and tadpoles were obtained by natural mating and staged according to the Nieuwkoop and Faber developmental table (Nieuwkoop and Faber, 1967). Tadpoles were anesthetized with a solution of 200 mg/mL of MS-222 (Sigma) and subsequently decapitated, in agreement with international bioethical recommendations (Close et al., 1996; Ramlochansingh et al., 2014). The Ethics Committee of the University of Concepcion (Concepcion, Chile) approved all experimental procedures carried out during this study, which were performed following the guidelines outlined in the Biosafety and Bioethics Manual of the National Commission of Scientific and Technological Research (CONICYT, Chilean Government). Sense probe negative *in situ* hybridization results are shown in **Data Sheet 2**. *In situ* hybridizations on paraffin sections were performed as previously described (see **Data Sheet 3** and Espinoza et al., 2010; Aldea et al., 2013).

Results

Skeletal Expression of the Major Fibrillar Collagen Genes in Scyliorhinus canicula Fins and Jaws

The Sc-*Col1a1*, Sc-*Col1a2*, and Sc-*Col2a1* protein sequences were unambiguously associated to their respective orthology

groups by phylogenetic analyses (Data Sheets 4, 5). We examined calcification patterns by Alizarin red, Alcian blue, and HES stainings as well as the expression of *Sc-Col1a1*, *Sc-Col1a2*, and *Sc-Col2a1* in developing *S.c.* fins and jaws (Figure 1).

Alizarin red is specific for high levels of calcium ions and will therefore stain calcified extracellular matrix, while Alcian blue has a strong affinity for glycosaminoglycans of the cartilage matrix. The HES staining classically allows the location of nuclei (dark purple), cytoplasm (pink), and densely organized collagen

fibers (orange-pink). Both Safran and the acid aniline dye Eosin will stain the mineralized matrix more intensely than the non-mineralized matrix. Transverse sections through the pectoral fins showed that cartilaginous radials are devoid of calcification both in 7 cm long embryos (Figures 1A–C') and 9 cm long embryos (not shown). By contrast, longitudinal sections of Meckel's cartilage from 9 cm long embryos allowed the detection of tesseræ calcification at the cartilage periphery (Figures 1H–J). Tesseræ calcification is associated to a darker HES staining of the hyaline matrix surrounding clusters of chondrocytes, and occurs

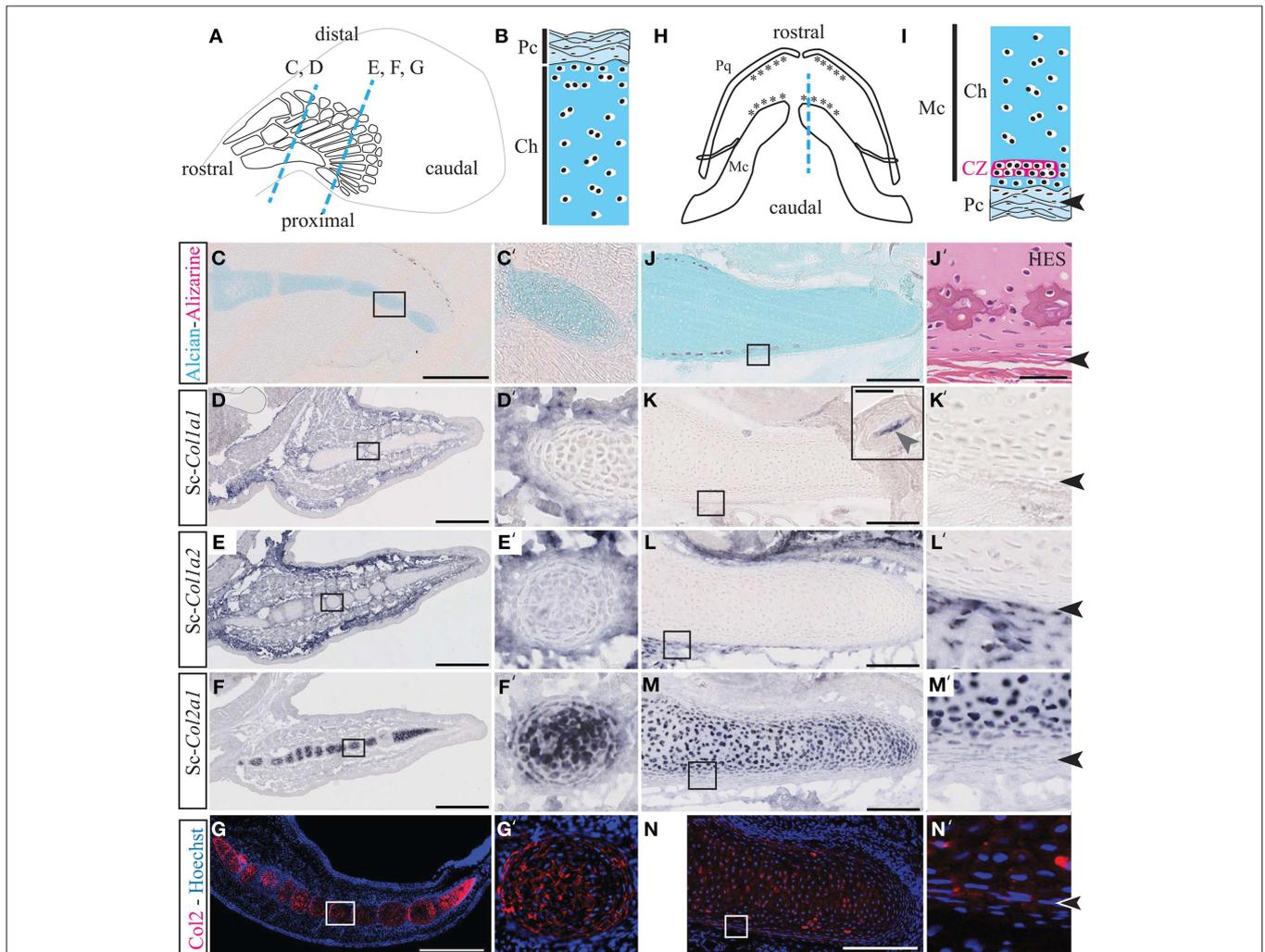


FIGURE 1 | Cartilage calcification and collagen expression in *Scyliorhinus canicula* radials and Meckel's cartilage. (A) Schematic drawing of the pectoral fin anatomy from 7 cm long *S.c.* embryos and of the orientation of the paraffin sections shown in C–G (blue dotted lines). Rostral and caudal refer to the embryonic axis. **(B)** General histology of pectoral skeletal elements, with the center of the cartilaginous element located at the bottom. **(C,C')** Alizarin red and Alcian blue double staining. **(D–F)** Gene expression patterns in the pectoral fin for *Sc-Col1a1* **(D)**, *Sc-Col1a2* **(E)**, and *Sc-Col2a1* **(F)**. **(G)** Immunofluorescence using an anti-Type II collagen (Col2) antibody specifically marks the pectoral fin cartilaginous condensations. **(H)** Schematic drawing of the jaw anatomy from 9 cm-long *S.c.* embryos (ventral view) and of the orientation of the paraffin sections shown in **(J–N)** (blue dotted line). **(I)** General histology of Meckel's cartilage, with the center of the cartilaginous element located at the top. The arrowheads in **(I,J'–N')** demarcate the fibrous perichondrium from the cartilage. **(J)** Alizarin red and Alcian blue double staining. **(J')** Higher magnification of a tesseræ located in a similar region as the area boxed in **(J)** and stained with HES. **(K–M)** Gene expression patterns in the jaw for *Sc-Col1a1* [the inset in **(K)** shows a *Sc-Col1a1* positive dermal denticle from the same section], *Sc-Col1a2* **(L)** and *Sc-Col2a1* **(M)**. **(N)** Immunofluorescence using an anti-Type II collagen (Col2) antibody specifically marks the cartilaginous condensations of Meckel's cartilage. Insets in **(C'–N')**, respectively. CZ, calcification zone of the tesseræ; Ch, chondrocytes; Fb, fibroblasts; Pc, perichondrium; Pq, palatoquadrate. Scale bars: **(C–G)**, 250 μm ; **(J–N)**, 100 μm .

within the cartilaginous scaffold, one or two cell diameters away from the fibrous perichondrium (**Figure 1J**).

In the pectoral fin, *Sc-Coll1a1* and *Sc-Coll1a2* are expressed in the fibrous perichondrium and the connective tissue surrounding the cartilaginous elements (**Figures 1D–E'**), and *Sc-Col2a1* is expressed in the chondrocytes of the cartilaginous matrix of the radials (**Figures 1F,F'**). In the jaw, we failed to detect *Sc-Coll1a1* at the level of Meckel's cartilage, albeit an intense staining was observed in dermal denticles located on the same section and serving as an internal positive control (**Figures 1K,K'**). *Sc-Coll1a2* and *Sc-Col2a1* transcripts were detected, respectively, in the fibrous perichondrium of Meckel's cartilage (**Figures 1L,L'**) and in the chondrocytes of the cartilaginous element (**Figures 1M,M'**). Immunofluorescence experiments performed on developing *S.c.* fins and jaws further confirmed the cartilage-specific expression of the *Sc-Col2a1* protein (**Figures 1G,G',N,N'**). The punctuated localization of *Sc-Col2a1* around the cell body of fin and jaw chondrocytes might result from low levels of expression, and is consistent with the concentration of this protein in the pericellular matrix, as reported in other species (Benjamin and Ralphs, 1991; Mizoguchi et al., 1997; Nah et al., 2001). Taken together, our results support the idea that *S.c.* tesserae growth and calcification occur within a Type I-negative and Type II-positive collagenous microenvironment (**Figures 1J–N'**).

Skeletal Expression of the Major Fibrillar Collagen Genes in *Scyliorhinus canicula* Vertebrae

The transverse sections of 6 cm embryos shown in **Figures 2A–D** reveal that the *S.c.* vertebrae are cartilaginous, devoid of calcification, and express *Sc-Col2a1* (in chondrocytes of the centrum and the neural arches) and *Sc-Coll1a1* and *Sc-Coll1a2* (in the perichondrium surrounding all vertebral elements). In the vertebral column of 7 cm-long embryos, Alcian blue stains the cartilaginous vertebrate body and the neural arches (**Figures 2E–I'**). Alizarin red specifically stains the fibrous perichondrium of the neural arches as well as an internal calcification ring located within the centrum and surrounding the notochord, as reported in other chondrichthyan species (see **Figures 2E–K** and Peignoux-Deville et al., 1982; Eames et al., 2007). Histologically, the calcified ring of the vertebral body exhibits darker HES staining of the matrix surrounding large cells of chondrocytic appearance (**Figures 2G,J**). By contrast, cells located in the calcifying extracellular matrix of the neural arches are thin with reduced amount of cytoplasm (**Figures 2H,K**).

The expression of *Sc-Coll1a1* and *Sc-Coll1a2* was evident in the fibrous perichondrium and the connective tissue surrounding all vertebral elements (**Figures 2L–M'**) as well as in scattered cells embedded in the calcified layer of the neural arches (arrowheads in **Figures 2L,M'**). Nor *Sc-Coll1a1* neither *Sc-Coll1a2* were detected in the calcified layer of the vertebral body (the lighter ring-shaped signal in **Figures 2L–M'** is identical to the background observed in negative controls, see **Data Sheet 2**). While *Sc-Col2a1* is expressed in most vertebral chondrocytes, it is significantly downregulated in cells embedded within the calcifying layer of the vertebral body (**Figures 2N,N'**).

Likewise, an anti-type II collagen antibody intensely stained the cartilaginous, non-calcified, vertebral cartilage of the neural arches, and the centrum, as well as a thin layer surrounding the notochord (**Figures 2O,O'**). In agreement with the *in situ* hybridization results, the calcifying regions of the neural arches and of the vertebral body displayed a much fainter reaction to the Type II collagen antibody (arrowheads in **Figures 2O,O'**). Taken together, these observations reveal a negative correlation between *Sc-Col2a1* expression and extracellular matrix calcification. By contrast, *Sc-Coll1a1* and *Sc-Coll1a2* are expressed in all perichondral cells of the vertebrae, regardless of their calcification degree.

Skeletal Expression of the Major Fibrillar Collagen Genes in the *Xenopus tropicalis* Limb

We examined the expression of *Xt-Coll1a1*, *Xt-Coll1a2*, and *Xt-Col2a1* in the diaphysis and epiphysis of *X.t.* hindlimbs both before (stage NF54, **Figures 3A–C**) and after (stage NF60, **Figures 3M–O**) ossification. At stage NF54, *Xt-Coll1a1*, and *Xt-Coll1a2* are most strongly expressed in perichondral cells of developing long bones (**Figures 3D–I**). At stage NF60, *Xt-Coll1a1*, and *Xt-Coll1a2* transcripts are robustly detected in osteoblasts and in some osteocytes, albeit more weakly (**Figures 3P–U**). Finally, *Xt-Col2a1* is expressed in all chondrocytes of NF54 non-calcified cartilaginous elements (**Figures 3J–L**), and is restricted to the epiphyseal chondrocytes at stage NF60 (**Figures 3V–X**).

Histology of the Developing *Xenopus tropicalis* Vertebrae

Because of the complex shape of the *X.t.* vertebrae, transverse sections either run through the lateral (**Figures 4A,D–F,K–P**) or the dorsal (**Figures 4A,G–I,Q–V**) region of the non-calcified (stage NF54, see **Figures 4B–I**) and calcified (stage NF57, see **Figures 4J–V**) neural arches protecting the neural tube. At stage NF57, the cartilage matrix is abundant (**Figures 4L,R**) and displays a pronounced HES and Alizarin red staining co-localizing at the level of the dorsal region underlying the notochord, and within the lateral and dorsal neural arches (see **Figures 4K,M,N,Q,S,T**). In addition, cartilage calcification and periosteal bone develop in contact to each other (**Figures 4O,P,U,V**).

Skeletal Expression of the Major Fibrillar Collagen Genes in the *Xenopus tropicalis* Vertebrae

Xt-Coll1a1, *Xt-Coll1a2*, and *Xt-Col2a1* expression patterns were examined in the lateral and dorsal neural arch regions of the vertebrae (see **Figures 4E,F,H,I,O,P,U,V**). At stage NF54, *Xt-Coll1a1*, and *Xt-Coll1a2* are expressed in scattered cells of mesenchymal appearance located in the vicinity of the cartilage (**Figures 5A,B**), as well as in a thin layer of perichondrium surrounding the dorsal neural arch (**Figures 5D,E**). At this early stage, *Xt-Col2a1* is expressed in all chondrocytes and is also evident in the perichondrium of the dorsal neural arch (**Figures 5C,F**). At stage NF57, *Xt-Coll1a1*, and *Xt-Coll1a2* are robustly expressed in osteoblasts lying onto the calcified

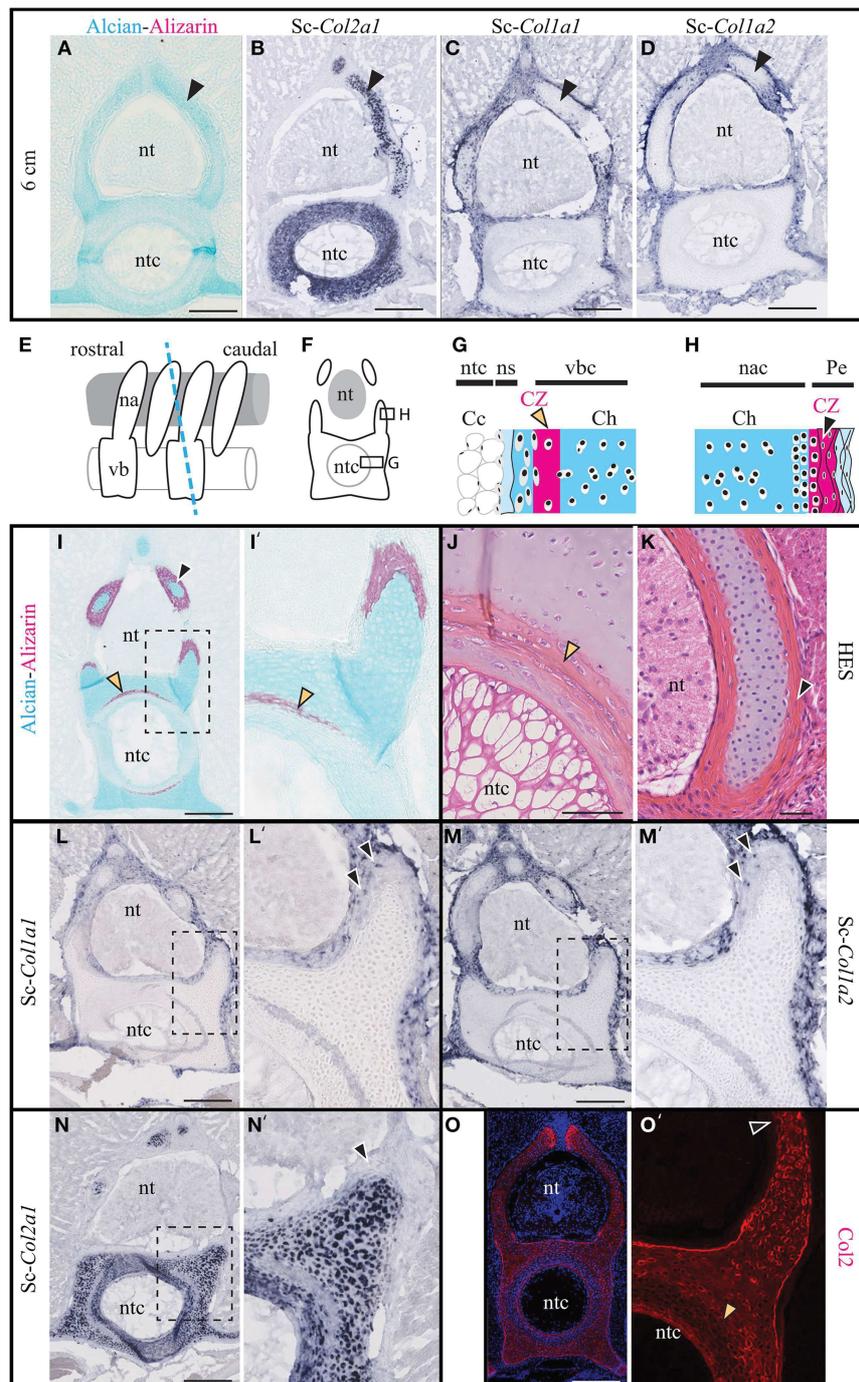


FIGURE 2 | Cartilage calcification and collagen expression in *Scylliorhinus canicula* vertebrae. (A–D) Transverse sections of the vertebrae of 6 cm-long embryos (black arrowheads show the hyaline cartilage of the neural arches). **(A)** Alcian blue and Alizarin red double staining revealing the distribution of the hyaline cartilage and the absence of detectable calcification. **(B–D)** *In situ* hybridizations showing the expression of *Sc-Col2a1*, *Sc-Col1a1*, and *Sc-Col1a2*, as indicated. **(E)** Schematic drawing of the vertebral anatomy from 9 cm-long *S.c.* embryos (lateral view) and of the orientation of the transverse sections (blue dotted line) represented in **(F)** and shown in **(I–O')**. **(G)** General histology of the centrum. **(H)** General histology of the neural arches. **(I)** Alizarin red and Alcian blue double staining. **(J, K)** HES staining of the centrum and of the neural arch. **(L–N)** *In situ* hybridizations showing the expression of *Sc-Col2a1*, *Sc-Col1a1*, and *Sc-Col1a2*, as indicated. Arrowheads in **(L', M')** indicate scattered *Sc-Col1a1* and *Sc-Col1a2* positive cells embedded in the calcified layer of the neural arches. **(O)** Immunofluorescence using an anti-Type II collagen (Col2) specific antibody. Higher magnifications of **(I, L–O)** are shown in **(I', L'–O')** respectively. Orange and black arrowheads show the calcifying matrix of the centrum and neural arches, respectively. Cc, chondrocytes; Ch, chondrocytes; na, neural arch; nac, neural arch cartilage; ns, notochord sheath; nt, neural tube; ntc, notochord core; Pe, perichondrium; vb, vertebral body; vbc, vertebral body cartilage. Insets in **(L–O)** are shown at higher magnification in **(L'–O')**, respectively. Scale bars: **(A–D)** 250 μm ; **(I, L–O)** 200 μm ; **(J, K)** 50 μm .

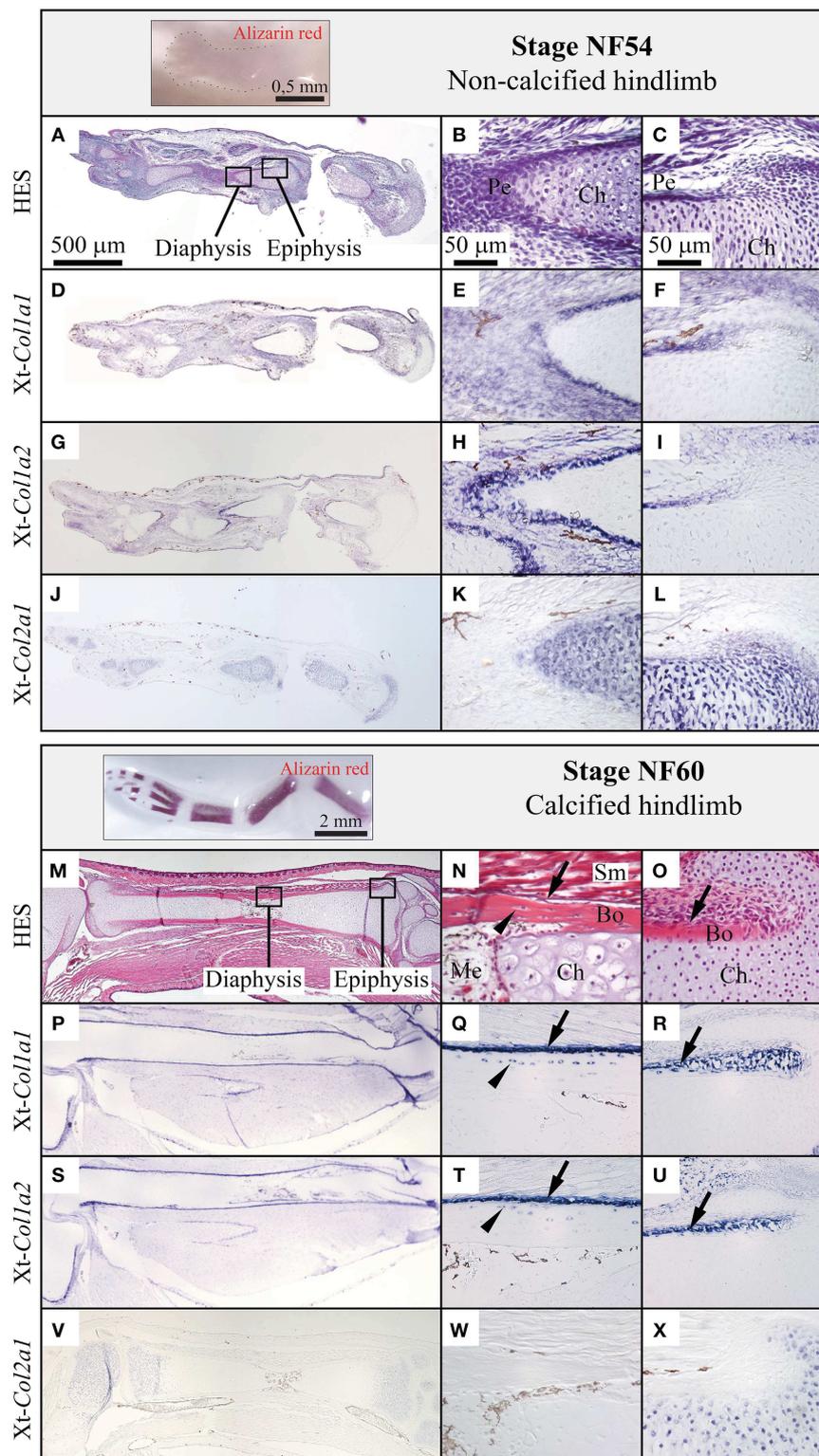


FIGURE 3 | Comparison of the *Col1a1*, *Col1a2*, and *Col2a1* expression patterns during *Xenopus tropicalis* hindlimb development. Stage NF54 (top panel) or NF60 (bottom panel) hindlimbs were examined by whole mount Alizarin red staining (insets), sectioned along the proximo-distal axis and stained with HES, (A–C, M–O) or processed by *in situ* hybridization for the *Xt-Col1a1*, *Xt-Col1a2*, and *Xt-Col2a1* probes, (D–L, P–X). Results are shown for the whole skeletal element (left column, scale bar: 500 μm) and higher magnifications of the diaphysis (middle column, scale bar: 50 μm) and epiphysis (right column, scale bar: 50 μm). Arrows and arrowheads show osteoblasts and osteocytes, respectively. *In situ* hybridization signal is light to dark blue, and brown endogenous *X.t.* pigment cells are visible on most sections. Legend: Bo, bone; Ch, chondrocytes; Me, medulla; Pe, perichondrium; Sm, striated muscles.

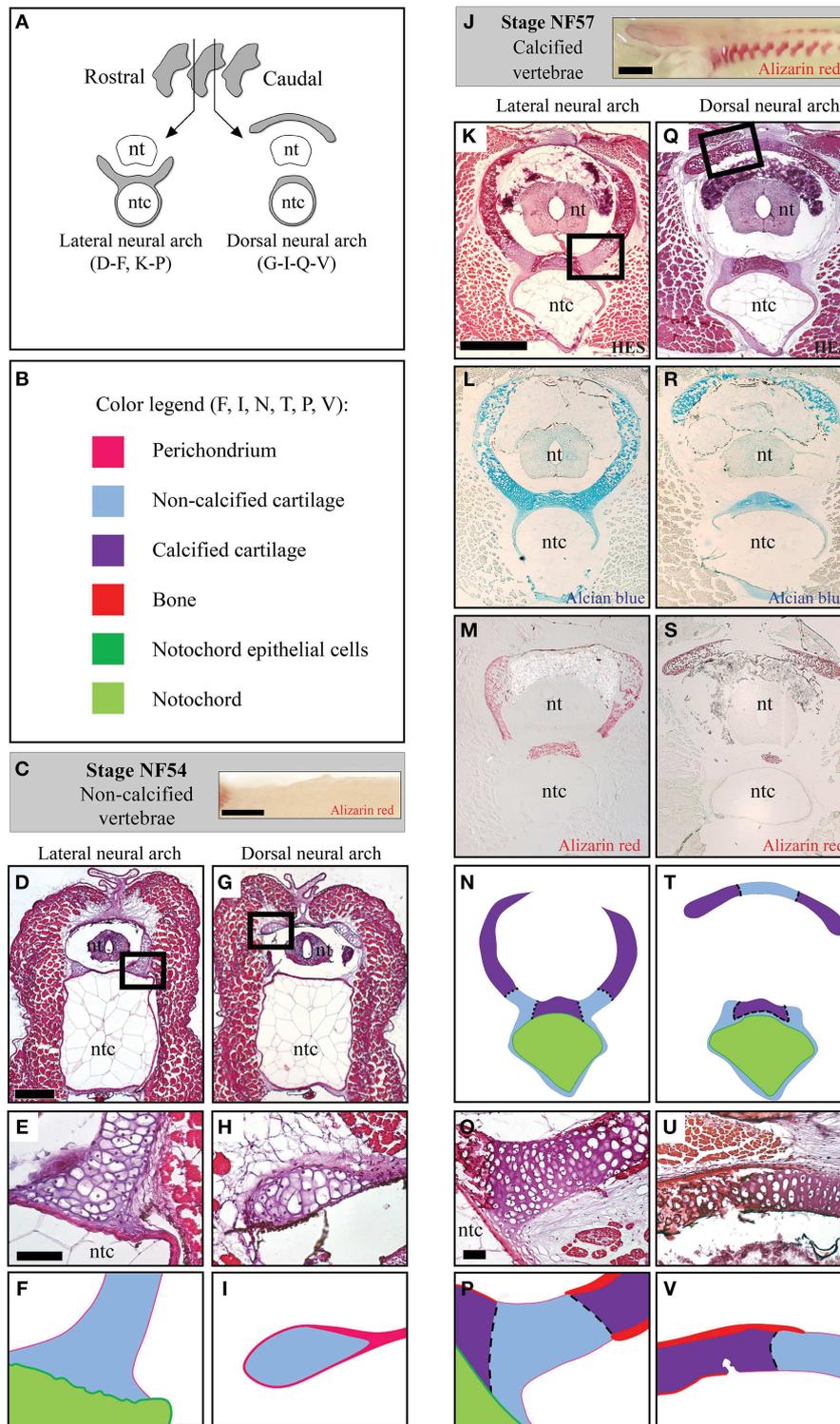


FIGURE 4 | Histology of the developing *Xenopus tropicalis* vertebrae. (A) Schematic drawing of transverse sections running through the lateral or the dorsal region of the neural arches. (B) Color code used to represent the distinct skeletal tissues of the *X.t.* vertebrae in (F,I,N,T,P,V). (C) Whole mount Alizarin red staining of stage NF54 vertebral column (lateral view, anterior to the left). (D–I) Histology of the stage NF54 vertebrae examined with HES (D,E,G,H). (J) Whole mount Alizarin red staining of stage NF57 vertebral columns (lateral view, anterior to the left). (K–V) Histology of the stage NF57 vertebrae examined with HES (K,O,Q,U), Alcian blue (L,R) and Alizarin red (M,S). Insets in D, G, K and Q are shown in F, I, P and V, respectively. Panels E, H, K, O, Q and U are schematized in F, I, N, P, T and V, respectively. Abbreviations: nt, neural tube; ntc, notochord. Scale bars: 1 mm in (C,J); 250 μm in (D,G); 50 μm in (E,F) and (H,I); 500 μm in (K–N) and (Q–T); and 50 μm in (O,P,U,V).

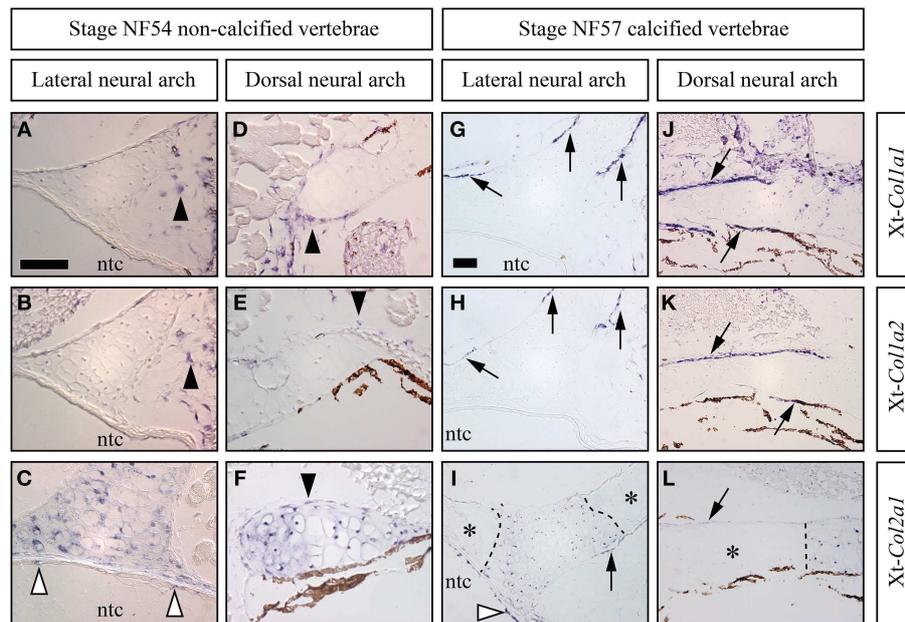


FIGURE 5 | Skeletal expression patterns the *Xt-Col1a1*, *Xt-Col1a2*, and *Xt-Col2a1* during *Xenopus tropicalis* vertebrae development. Transverse sections of stage NF54 (A–F) and NF57 (G–L) vertebrae processed for *in situ* hybridizations using the *Xt-Col1a1*, *Xt-Col1a2*, and *Xt-Col2a1* probes, as indicated. Black arrowheads show loose (A,B) or perichondral (D–F) cells. White arrowheads in (C,I) show *Xt-Col2a1* positive epithelial non-vacuolated cells of the notochord. Arrows point at osteoblasts expressing *Xt-Col1a1* (G,J), *Xt-Col1a2* (H,K), or *Xt-Col2a1* (I,L). In (I,L), calcified, Alizarin red-positive cartilaginous regions are marked by an asterisk and the dotted lines demarcates expression boundaries between *Xt-Col2a1* positive and *Xt-Col2a1* negative chondrocytes. *In situ* hybridization signal is light to dark blue. Brown endogenous *X.t.* pigment cells are also visible in the vicinity of the dorsal neural arch (D–F, J–L). Scale bar in (A) represents 50 μm in (A–F); scale bar in (G) represents 50 μm in (G–L).

bone matrix of the vertebrae (arrows in Figures 5G,H,J,K). These osteoblasts also express *Xt-Col2a1*, albeit more weakly than hypertrophic chondrocytes (Figures 5I,L). In chondrocytes, *Xt-Col2a1* is excluded from the Alizarin red-positive regions (asterisk in Figures 5I,L), forming sharp expression boundaries between calcified and non-calcified cartilage (dotted line in Figures 4P,V, 5I,L). In addition, at stages NF54 and NF57, we detected a strong *Xt-Col2a1* staining in the epithelial non-vacuolated cells of the notochord (arrowheads in Figures 5C,I), a known site of *Col2a1* expression in cyclostomes and teleosts (Ota and Kuratani, 2010; Yamamoto et al., 2010).

Discussion

Conserved Early Molecular Patterning of the Hyaline Cartilage and Non-calcified Perichondrium

In non-calcified *S.c.* skeletal elements, the expression patterns of the *Col1a1/Col1a2* (perichondrium) and *Col2a1* (cartilage) genes do not overlap. By contrast, in actinopterygians, *Col2a1* orthologs are expressed in the perichondrium, albeit at lower levels than in cartilage (Albertson et al., 2010; Eames et al., 2012). Likewise, our results in *X.t.* reveal a faint *Xt-Col2a1* expression in the non-calcified perichondrium of the dorsal neural arch at stage NF54. It is likely that more sensitive techniques will help assess the expression levels of *Xt-Col2a1* in the perichondrium

of the *X.t.* lateral neural arch or hindlimb, two sites where it was not detected by *in situ* hybridization. Interestingly, Clade A fibrillar collagen members from lamprey and hagfish are expressed both in perichondral cells and in chondrocytes, while the amphioxus ortholog is expressed in chondrocytes and in the mesenchyme located at the tip of regenerating cirri (Zhang and Cohn, 2006, 2008; Zhang et al., 2006; Ota and Kuratani, 2010; Cattell et al., 2011; Kaneto and Wada, 2011). Altogether, these data suggest that the largely complementary expression patterns of *Col1a1/Col1a2* (exclusively in the fibrous perichondrium) and *Col2a1* (preferentially in the hyaline cartilage) represent a synapomorphy of non-calcified skeletal elements in jawed vertebrates. It is therefore tempting to propose that the Clade A precursor was expressed in chondrocytes and perichondral cells, and that the functional partitioning of ancestral enhancers was involved in this expression divergence (Force et al., 1999; Zhang and Cohn, 2008). According to this scenario, after the genomic duplications that gave rise to the complete set of Clade A members, the *Col1a1* and *Col1a2* genes would have rapidly lost their cartilage-specific enhancers, while the activity of perichondral *Col2a1* enhancers would have been dramatically reduced, or abolished, in distinct jawed vertebrate lineages.

Col2a1 Osteoblastic Expression was Significantly Reduced in the Tetrapod Lineage

We detected *X.t.* *Col2a1* transcripts in osteoblasts of the vertebrae, albeit they displayed a weaker *in situ* hybridization

signal than hypertrophic chondrocytes present on the same section (Figures 5I,L), which is consistent with expression results obtained with primary cultures of *X.t.* osteoblasts (Bertin et al., 2015). While *Col2a1* is traditionally considered to be a chondrocyte-specific marker (Kobayashi and Kronenberg, 2005; Hartmann, 2009), its robust osteoblastic expression has been reported in embryos from several species of actinopterygian fishes (Benjamin and Ralphs, 1991; Albertson et al., 2010; Eames et al., 2012). The moderate *Col2a1* expression levels described in the clawed frog (this study), chick (Abzhanov et al., 2007) and mouse (Hilton et al., 2007) therefore support the idea that the osteogenic transcription of *Col2a1* was significantly reduced in the tetrapod lineage, and almost completely abolished in mammals (Figure 6).

Scyliorhinus canicula Neural Arches, Tesseræ, and Centrum Calcification Occur in Distinct Molecular Contexts

Our results reveal that at least three skeletal sites expressing different combinations of collagen genes are associated with robust *S.c.* calcification in: (i) the fibrous perichondrium of the neural arches, (ii) the tesseræ developing in Meckel’s cartilage, and (iii) the compact cartilage embedded within the vertebral bodies.

In neural arches, the cartilaginous scaffold is surrounded by a fibrous perichondrium whose matrix is highly calcified and devoid of Col2 protein, and whose cells express *Sc-Col1a1* and *Sc-Col1a2* and no detectable levels of *Sc-Col2a1* (Figures 2, 5). The evolutionary relationship between this calcified perichondrium

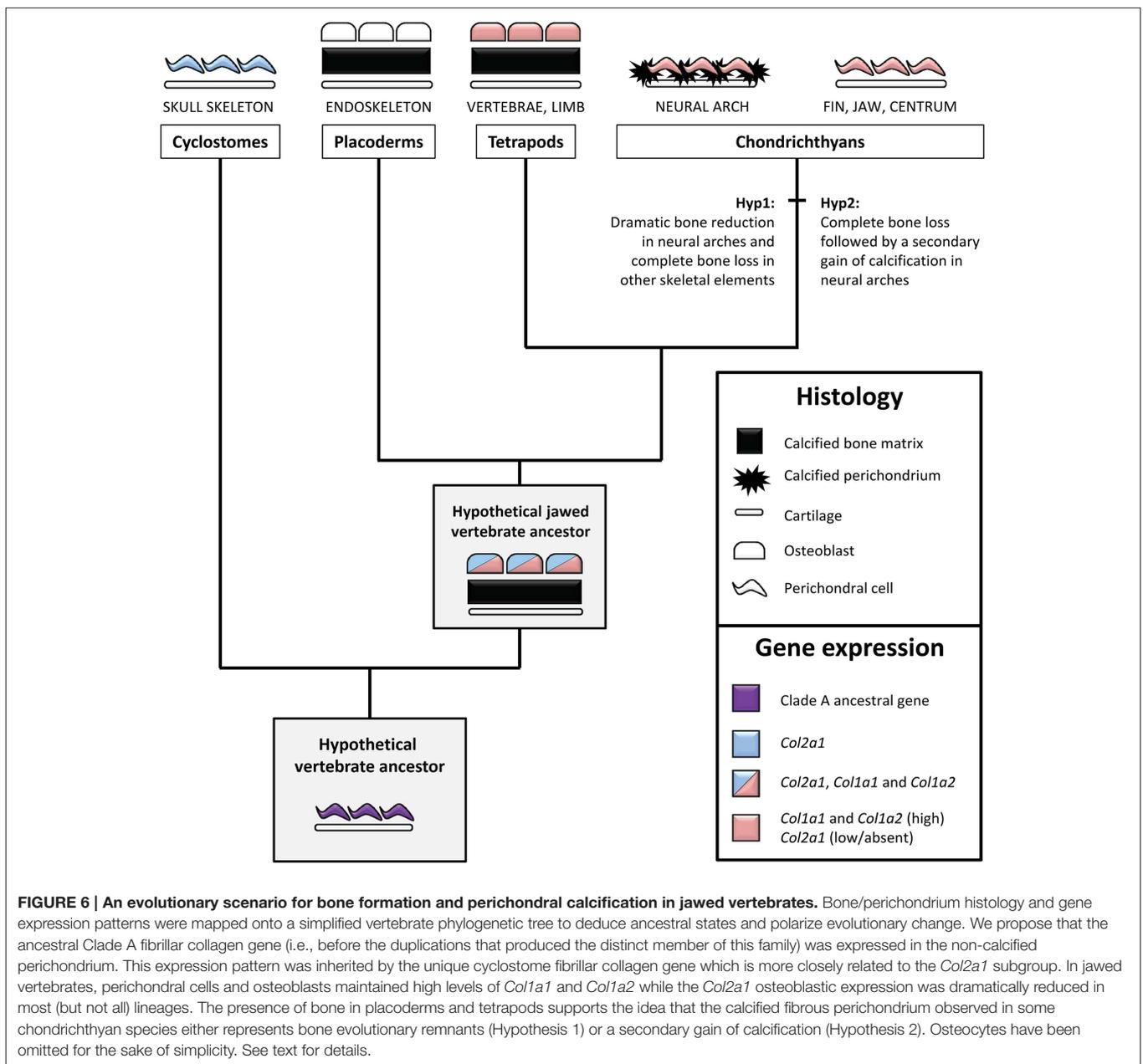


FIGURE 6 | An evolutionary scenario for bone formation and perichondral calcification in jawed vertebrates. Bone/perichondrium histology and gene expression patterns were mapped onto a simplified vertebrate phylogenetic tree to deduce ancestral states and polarize evolutionary change. We propose that the ancestral Clade A fibrillar collagen gene (i.e., before the duplications that produced the distinct member of this family) was expressed in the non-calcified perichondrium. This expression pattern was inherited by the unique cyclostome fibrillar collagen gene which is more closely related to the *Col2a1* subgroup. In jawed vertebrates, perichondral cells and osteoblasts maintained high levels of *Col1a1* and *Col1a2* while the *Col2a1* osteoblastic expression was dramatically reduced in most (but not all) lineages. The presence of bone in placoderms and tetrapods supports the idea that the calcified fibrous perichondrium observed in some chondrichthyan species either represents bone evolutionary remnants (Hypothesis 1) or a secondary gain of calcification (Hypothesis 2). Osteocytes have been omitted for the sake of simplicity. See text for details.

and the osteichthyan bone has remained enigmatic and controversial (Peignoux-Deville et al., 1982; Eames et al., 2007; Zhang et al., 2009; Ryll et al., 2014). In the light of fossil evidence demonstrating that extant chondrichthyans are quite derived, having lost the perichondral bone surrounding the cartilaginous elements (Coates et al., 1998; Donoghue and Sansom, 2002), two hypotheses might account for the unusual calcification pattern observed in neural arches (Figure 6). On the one hand, it is possible that the perichondral bone was dramatically reduced to some evolutionary remnants of calcified fibrous perichondrium located in the neural arches (hypothesis 1). In this case, the cells involved in matrix calcification would correspond to highly derived osteoblasts having lost many crucial cellular features typically observed in osteichthyans, such as the ability to organize as a polarized pseudoepithelium (Izu et al., 2011; Liu et al., 2011). On the other hand, the perichondral bone might have been completely lost, and secondarily compensated by an independent ability to calcify the perichondral extracellular matrix (hypothesis 2). Below, we discuss two complementary strategies that might help resolve this issue. Firstly, a broader phylogenetic sampling is required to precisely assess the occurrence of a calcified perichondrium in neural arches, which currently seems to be limited to some chondrichthyan species. For instance, the skeleton of holocephalans displays little or no calcified tissue (a ring-shaped calcification of the centrum is reported in some fossil holocephalan and in the extant genus *Chimaera*) while batoids (rays and skates) have a tesserae-based calcification at the surface of their vertebral units (Reynolds, 1897; Goodrich, 1930; Zangerl, 1981). Secondly, it will be important to investigate the nature of the *Colla1* and *Colla2* positive cells embedded within the mineralized matrix (Figures 2E,F'). Indeed, such cells have been proposed to be osteocytes (Peignoux-Deville et al., 1982), which is consistent with the fact that cellular bone evolved before the origin of the jawed vertebrates (Donoghue and Sansom, 2002; Donoghue et al., 2006; Sanchez et al., 2013). Extensive phenotypical and molecular similarities between the scattered cells embedded within the *S.c.* calcified perichondrium and osteichthyan osteocytes would support their homology, and, therefore, the aforementioned hypothesis 1.

Another site of calcification in *S.c.* corresponds to the developing tesserae embedded in Meckel's cartilage, a process classically described to occur at the surface of the cartilaginous skeletal piece (Kemp and Westrin, 1979; Dean et al., 2009). As we show here, the onset of this type of calcification takes place in a *Col2*-positive context, within the cartilaginous scaffold (Figures 1, 6). We failed to detect *Colla1/Colla2* expression in the chondrocytes neighboring the mineralized matrix, suggesting that the cellular processes involved in matrix calcification are very different from what has been described in osteichthyan bone or chondroid bone (Mizoguchi et al., 1997). This type of calcification is well developed in extant batoid and selachimorph species, and is also known in fossil holocephalan species (Grogan and Lund, 2000; Finarelli and Coates, 2014) and, therefore, is considered to be an early evolutionary innovation of the chondrichthyan lineage (Figure 7).

Below, we will discuss the third type of calcification mechanism, which occurs in the *Colla1/Colla2*

negative *S.c.* vertebral cartilage experiencing a drastic *Col2a1* downregulation, in the light of the striking similarities that it shares with the *X.t.* vertebrae.

An Ancient Type of Calcified Vertebral Cartilage Associated to the Down-regulation of *Col2a1*

The tetrapod hyaline cartilage calcifies its extracellular matrix, albeit to a much lesser extent than the bone tissue (Claassen et al., 1996; Khanarian et al., 2014) and, therefore, only weakly stains with Alizarin red (Kirsch et al., 1997). Here, we report an unusual type of calcified cartilage displaying remarkable similarities between *X.t.* and *S.c.* at three distinct biological levels: (i) anatomically, this cartilage is located in the vertebrae of both species, and, at least at the stages analyzed, in no other skeletal elements; (ii) from an histological perspective its robust calcification is reflected by intense Alizarin red and HES stainings; (iii) molecularly, both types of cartilages are *Colla1/Colla2* negative and probably experience a *Col2a1* downregulation, because in both species all cells of the vertebral cartilage express *Col2a1* during early, non-calcified, developmental stages (see Figures 2B,N,N', 5C,E,I,L). In this respect, both types of vertebral cartilages seem to recapitulate the initial phase of endochondral bone formation typically seen in tetrapod long bones, during which proliferative chondrocytes progressively downregulate the expression of *Col2a1*, undergo hypertrophy, and calcify their extracellular matrix (Figure 7). Our observations, combined to data from mouse (Chandraraj and Briggs, 1988), and lizards (Lozito and Tuan, 2015), suggest that an calcified form of vertebral cartilage was present in the last common ancestor of jawed vertebrates, at least as a transitory developmental process.

As vertebral developmental processes are highly variable, homology relationships between the calcified ring surrounding the *S.c.* notochord and the calcified cartilage of the *X.t.* vertebrae cannot be inferred (Fleming et al., 2015). Rather, we propose that the genetic programme involving a downregulation of the *Col2a1* gene predates the emergence of the last vertebrate common ancestor, and was subsequently co-opted and modified to produce a variety of novel non-calcified (Zhang and Cohn, 2006; Zhang et al., 2009) and calcified (Hogg, 1982; Claassen et al., 1996; Janvier and Arsenaault, 2002; Porter et al., 2007) cartilaginous structures (Figure 7). One intriguing possibility is that the ancient, *Col2a1*-negative, calcified cartilage present in the last common ancestor of jawed vertebrates later came to play a key role in the subsequent elimination of cartilaginous matrix and its replacement by bone tissue. In this respect, it might have served as a crucial pre-patterning step contributing to the emergence of endochondral ossification commonly observed in tetrapods and whose precise origin still remains to be determined. In the future, a comprehensive comparison of gene expression signatures between cell types present in diverse skeletal tissues, anatomical locations, developmental stages, and species will provide a solid basis to unravel the complex and fascinating evolutionary history of the vertebrate skeleton.

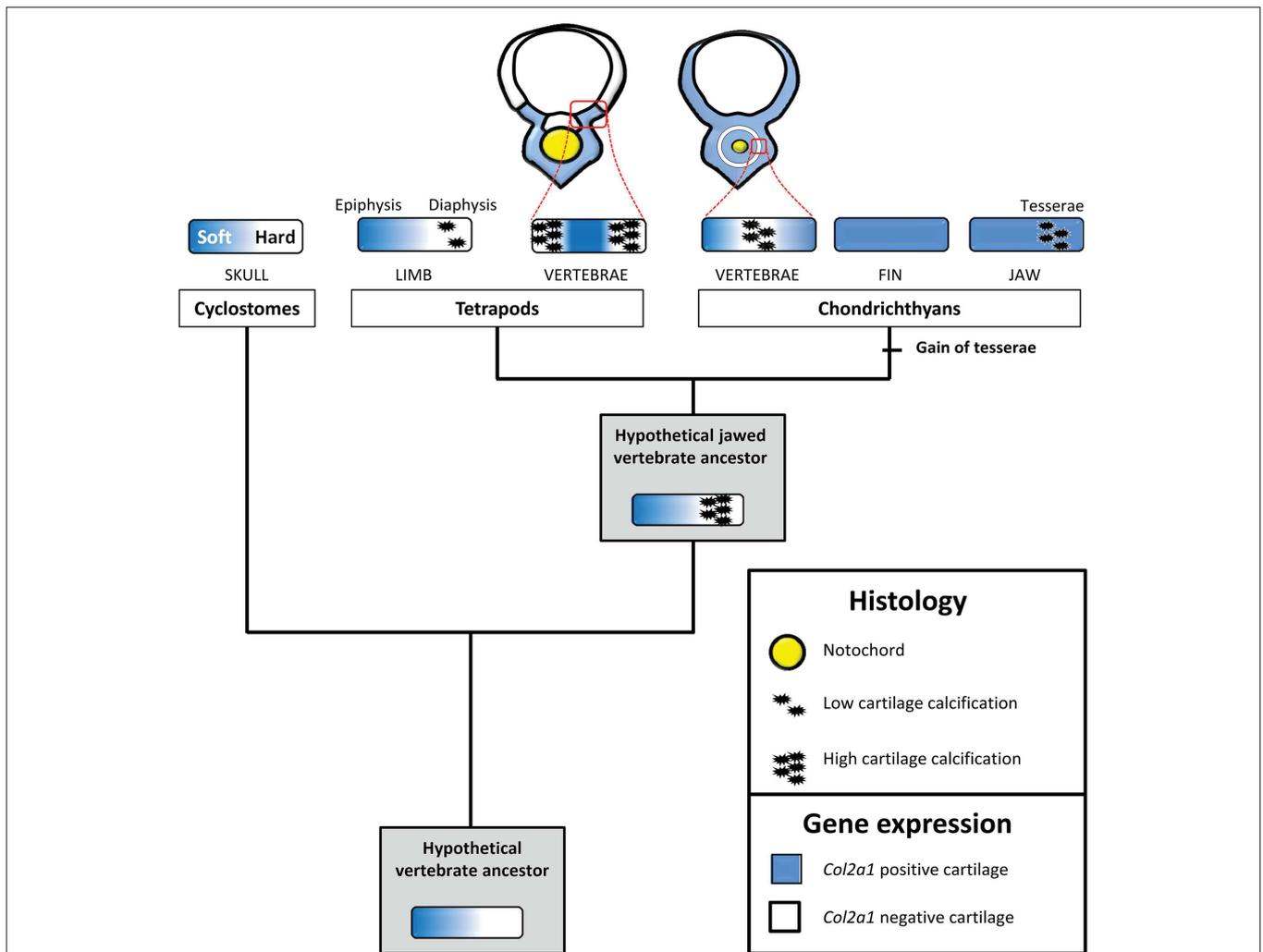


FIGURE 7 | An evolutionary scenario for cartilage calcification in jawed vertebrates. Expression patterns and cartilage matrix calcification were mapped onto a simplified vertebrate phylogenetic tree to deduce ancestral states and polarize evolutionary change. We propose that, in the last vertebrate common ancestor, the expression of *Col2a1* experienced a strong downregulation in maturing, non-calcified, cartilaginous regions. This downregulation was subsequently inherited by distinct vertebrate lineages, and is associated to hard cartilage in cyclostomes and to calcified cartilage in jawed vertebrates. The chondrichthyan and osteichthyan representatives analyzed in this study display a calcified *Col2a1*-negative vertebral cartilage, a likely jawed vertebrate synapomorphy. Tesserae calcification, a recent chondrichthyan innovation, occurs in the absence of *Col2a1* downregulation. Perichondrium and bone have been omitted for the sake of simplicity. See text for details.

Acknowledgments

We are grateful to both reviewers for their constructive comments that improved the quality of the present manuscript. We thank Isabelle Germon, Marie-Ka Tilak and Fabienne Justy for help with molecular biology. This research was funded by a FONDECYT grant 1151196 to SM and by PEPS ExoMOD to MDT. This is ISEM contribution # ISEM 2015-146.

Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2015.00283>

Supplementary Table 1 | list of *Scyliorhinus canicula* and *Xenopus tropicalis* specific primers.

Data Sheet 1 | Sequences of the *S.c.* clones.

Data Sheet 2 | Sense probe negative *in situ* hybridization results for *Scyliorhinus canicula* and *Xenopus tropicalis*.

Data Sheet 3 | *X.t.* *in situ* hybridization protocol.

Data Sheet 4 | Molecular Phylogenetic analysis of gnathostome Clade A fibrillar collagen genes. Phylogenetic relationships were inferred and the tree with the highest log likelihood (-7413.8950) is shown. The percentages of trees in which the associated taxa clustered together are indicated. The tree is drawn to scale, and branch lengths correspond to the number of substitutions per site. Orthology groups (OG) are identified as blue circles, and *S.c.* sequences are shown in red. The tree was rooted according to (Zhang and Cohn, 2008).

Data Sheet 5 | Fibrillar collagen sequences.

References

- Abzhanov, A., Rodda, S. J., McMahon, A. P., and Tabin, C. J. (2007). Regulation of skeletogenic differentiation in cranial dermal bone. *Development* 134, 3133–3144. doi: 10.1242/dev.002709
- Albertson, R. C., Yan, Y. L., Titus, T. A., Pisano, E., Vacchi, M., Yelick, P. C., et al. (2010). Molecular pedomorphism underlies craniofacial skeletal evolution in Antarctic notothenioid fishes. *BMC Evol. Biol.* 10:4. doi: 10.1186/1471-2148-10-4
- Aldea, D., Hanna, P., Munoz, D., Espinoza, J., Torrejon, M., Sachs, L., et al. (2013). Evolution of the vertebrate bone matrix: an expression analysis of the network forming collagen paralogues in amphibian osteoblasts. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 320, 375–384. doi: 10.1002/jez.b.22511
- Arendt, D. (2008). The evolution of cell types in animals: emerging principles from molecular studies. *Nat. Rev. Genet.* 9, 868–882. doi: 10.1038/nrg2416
- Benjamin, M., and Evans, E. J. (1990). Fibrocartilage. *J. Anat.* 171, 1–15.
- Benjamin, M., and Ralphs, J. R. (1991). Extracellular matrix of connective tissues in the heads of teleosts. *J. Anat.* 179, 137–148.
- Bertin, A., Hanna, P., Otarola, G., Fritz, A., Henriquez, J. P., and Marcellini, S. (2015). Cellular and molecular characterization of a novel primary osteoblast culture from the vertebrate model organism *Xenopus tropicalis*. *Histochem. Cell Biol.* 143, 431–442. doi: 10.1007/s00418-014-1289-8
- Cattell, M., Lai, S., Cerny, R., and Medeiros, D. M. (2011). A new mechanistic scenario for the origin and evolution of vertebrate cartilage. *PLoS ONE* 6:e22474. doi: 10.1371/journal.pone.0022474
- Chandraraj, S., and Briggs, C. A. (1988). Role of cartilage canals in osteogenesis and growth of the vertebral centra. *J. Anat.* 158, 121–136.
- Claassen, H., Kampen, W. U., and Kirsch, T. (1996). Localization of collagens and alkaline phosphatase activity during mineralization and ossification of human first rib cartilage. *Histochem. Cell Biol.* 105, 213–219. doi: 10.1007/BF01462294
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E. M., Bromage, N., Bunyan, J., et al. (1996). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. *Lab. Anim.* 30, 293–316. doi: 10.1258/002367796780739871
- Coates, M. I., Sequeira, S. E. K., Sansom, I. J., and Smith, M. M. (1998). Spines and tissues of ancient sharks. *Nature* 396, 729–730. doi: 10.1038/25467
- Dahdul, W. M., Balhoff, J. P., Blackburn, D. C., Diehl, A. D., Haendel, M. A., Hall, B. K., et al. (2012). A unified anatomy ontology of the vertebrate skeletal system. *PLoS ONE* 7:e51070. doi: 10.1371/journal.pone.0051070
- Dean, M. N., Chiou, W. A., and Summers, A. P. (2005). Morphology and ultrastructure of prismatic calcified cartilage. *Microsc. Microanal.* 11, 1196–1197. doi: 10.1017/S1431927605507888
- Dean, M. N., Mull, C. G., Gorb, S. N., and Summers, A. P. (2009). Ontogeny of the tessellated skeleton: insight from the skeletal growth of the round stingray *Urolophus halleri*. *J. Anat.* 215, 227–239. doi: 10.1111/j.1469-7580.2009.01116.x
- Dean, M. N., and Summers, A. P. (2006). Mineralized cartilage in the skeleton of chondrichthyan fishes. *Zoology (Jena.)* 109, 164–168. doi: 10.1016/j.zool.2006.03.002
- Donoghue, P. C., and Sansom, I. J. (2002). Origin and early evolution of vertebrate skeletonization. *Microsc. Res. Tech.* 59, 352–372. doi: 10.1002/jemt.10217
- Donoghue, P. C., Sansom, I. J., and Downs, J. P. (2006). Early evolution of vertebrate skeletal tissues and cellular interactions, and the canalization of skeletal development. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 306, 278–294. doi: 10.1002/jez.b.21090
- Eames, B. F., Allen, N., Young, J., Kaplan, A., Helms, J. A., and Schneider, R. A. (2007). Skeletogenesis in the swell shark *Cephaloscyllium ventriosum*. *J. Anat.* 210, 542–554. doi: 10.1111/j.1469-7580.2007.00723.x
- Eames, B. F., Amores, A., Yan, Y. L., and Postlethwait, J. H. (2012). Evolution of the osteoblast: skeletogenesis in gar and zebrafish. *BMC Evol. Biol.* 12:27. doi: 10.1186/1471-2148-12-27
- Eames, B. F., de la Fuente, L., and Helms, J. A. (2003). Molecular ontogeny of the skeleton. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 69, 93–101. doi: 10.1002/bdrc.10016
- Espinoza, J., Sanchez, M., Sanchez, A., Hanna, P., Torrejon, M., Buisine, N., et al. (2010). Two families of *Xenopus tropicalis* skeletal genes display well-conserved expression patterns with mammals in spite of their highly divergent regulatory regions. *Evol. Dev.* 12, 541–551. doi: 10.1111/j.1525-142X.2010.00440.x
- Estêvão, M. D., Silva, N., Redruello, B., Costa, R., Gregório, S., Canário, A. V., et al. (2011). Cellular morphology and markers of cartilage and bone in the marine teleost *Sparus auratus*. *Cell Tissue Res.* 343, 619–635. doi: 10.1007/s00441-010-1109-y
- Eyre, D. R., and Weis, M. A. (2013). Bone collagen: new clues to its mineralization mechanism from recessive osteogenesis imperfecta. *Calcif. Tissue Int.* 93, 338–347. doi: 10.1007/s00223-013-9723-9
- Finarelli, J. A., and Coates, M. I. (2014). *Chondrenchelys problematica* (Traquair, 1888) redescribed: a Lower Carboniferous, eel-like holocephalan from Scotland. *Earth Environ. Sci. Trans. R. Soc. Edinb.* 105, 35–59. doi: 10.1017/S1755691014000139
- Fleming, A., Kishida, M. G., Kimmel, C. B., and Keynes, R. J. (2015). Building the backbone: the development and evolution of vertebral patterning. *Development* 142, 1733–1744. doi: 10.1242/dev.118950
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L., and Postlethwait, J. (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151, 1531–1545.
- Goodrich, E. S. (ed.). (1930). *Studies on the Structure and Development of Vertebrates*. London: Macmillan.
- Grogan, E. D., and Lund, R. (2000). Debeerius ellefseni (Fam. Nov., Gen. Nov., Spec. Nov.), an autodiastylic chondrichthyan from the Mississippian bear gulch limestone of Montana (USA), the relationships of the chondrichthyes, and comments on gnathostome evolution. *J. Morphol.* 243, 219–245. doi: 10.1002/(SICI)1097-4687(200003)243:3<219::AID-JMORI>3.0.CO;2-1
- Hartmann, C. (2009). Transcriptional networks controlling skeletal development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 437–443. doi: 10.1016/j.gde.2009.09.001
- Hilton, M. J., Tu, X., and Long, F. (2007). Tamoxifen-inducible gene deletion reveals a distinct cell type associated with trabecular bone, and direct regulation of PTHrP expression and chondrocyte morphology by Ihh in growth region cartilage. *Dev. Biol.* 308, 93–105. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.05.011
- Hogg, D. A. (1982). Ossification of the laryngeal, tracheal and syringeal cartilages in the domestic fowl. *J. Anat.* 134, 57–71.
- Huysseune, A., and Sire, J. Y. (1990). Ultrastructural observations on chondroid bone in the teleost fish *Hemichromis bimaculatus*. *Tissue Cell* 22, 371–383. doi: 10.1016/0040-8166(90)90011-W
- Huysseune, A., and Verraes, W. (1986). Chondroid bone on the upper pharyngeal jaws and neurocranial base in the adult fish *Astatotilapia elegans*. *Am. J. Anat.* 177, 527–535. doi: 10.1002/aja.1001770411
- Izu, Y., Sun, M., Zwolanek, D., Veit, G., Williams, V., Cha, B., et al. (2011). Type XII collagen regulates osteoblast polarity and communication during bone formation. *J. Cell Biol.* 193, 1115–1130. doi: 10.1083/jcb.2010.10010
- Janvier, P. (2015). Facts and fancies about early fossil chordates and vertebrates. *Nature* 520, 483–489. doi: 10.1038/nature14437
- Janvier, P., and Arsenault, M. (2002). Palaeobiology: calcification of early vertebrate cartilage. *Nature* 417, 609. doi: 10.1038/417609a
- Kaneto, S., and Wada, H. (2011). Regeneration of amphioxus oral cirri and its skeletal rods: implications for the origin of the vertebrate skeleton. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 316, 409–417. doi: 10.1002/jez.b.21411
- Kemp, N. E., and Westrin, S. K. (1979). Ultrastructure of calcified cartilage in the endoskeletal tesserae of sharks. *J. Morphol.* 160, 75–109. doi: 10.1002/jmor.1051600106
- Kerney, R., and Hanken, J. (2008). Gene expression reveals unique skeletal patterning in the limb of the direct-developing frog, *Eleutherodactylus coqui*. *Evol. Dev.* 10, 439–448. doi: 10.1111/j.1525-142X.2008.00255.x
- Khanarian, N. T., Boushell, M. K., Spalazzi, J. P., Pleshko, N., Boskey, A. L., and Lu, H. H. (2014). FTIR-I compositional mapping of the cartilage-to-bone interface as a function of tissue region and age. *J. Bone Miner. Res.* 29, 2643–2652. doi: 10.1002/jbmr.2284
- Kirsch, T., Nah, H. D., Shapiro, I. M., and Pacifici, M. (1997). Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. *J. Cell Biol.* 137, 1149–1160. doi: 10.1083/jcb.137.5.1149
- Kobayashi, T., and Kronenberg, H. (2005). Minireview: transcriptional regulation in development of bone. *Endocrinology* 146, 1012–1017. doi: 10.1210/en.2004-1343

- Kranenbarg, S., van Cleynebreugel, T., Schipper, H., and Van Leeuwen, J. (2005). Adaptive bone formation in acellular vertebrae of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Exp. Biol.* 208, 3493–3502. doi: 10.1242/jeb.01808
- Landis, W. J., and Silver, F. H. (2009). Mineral deposition in the extracellular matrices of vertebrate tissues: identification of possible apatite nucleation sites on type I collagen. *Cells Tissues Organs* 189, 20–24. doi: 10.1159/000151454
- Le, S. Q., and Gascuel, O. (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1307–1320. doi: 10.1093/molbev/msn067
- Li, N., Felber, K., Elks, P., Croucher, P., and Roehl, H. H. (2009). Tracking gene expression during zebrafish osteoblast differentiation. *Dev. Dyn.* 238, 459–466. doi: 10.1002/dvdy.21838
- Liu, L., Schlesinger, P. H., Slack, N. M., Friedman, P. A., and Blair, H. C. (2011). High capacity Na(+)/H(+) exchange activity in mineralizing osteoblasts. *J. Cell. Physiol.* 226, 1702–1712. doi: 10.1002/jcp.22501
- Long, F. (2011). Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 27–38. doi: 10.1038/nrm3254
- Lozito, T. P., and Tuan, R. S. (2015). Lizard tail regeneration: regulation of two distinct cartilage regions by Indian hedgehog. *Dev. Biol.* 399, 249–262. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.12.036
- Mizoguchi, I., Takahashi, I., Sasano, Y., Kagayama, M., Kuboki, Y., and Mitani, H. (1997). Localization of types I, II and X collagen and osteocalcin in intramembranous, endochondral and chondroid bone of rats. *Anat. Embryol.* 196, 291–297. doi: 10.1007/s004290050098
- Nah, H. D., Swoboda, B., Birk, D. E., and Kirsch, T. (2001). Type IIA procollagen: expression in developing chicken limb cartilage and human osteoarthritic articular cartilage. *Dev. Dyn.* 220, 307–322. doi: 10.1002/dvdy.1109
- Nieuwkoop, P. D., and Faber, J. (1967). *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*. Amsterdam: North Holland.
- Omelon, S., Georgiou, J., Variola, F., and Dean, M. N. (2014). Colocation and role of polyphosphates and alkaline phosphatase in apatite biomineralization of elasmobranch tesseræ. *Acta Biomater.* 10, 3899–3910. doi: 10.1016/j.actbio.2014.06.008
- Ota, K. G., and Kuratani, S. (2010). Expression pattern of two collagen type 2 alpha1 genes in the Japanese inshore hagfish (*Eptatretus burgeri*) with special reference to the evolution of cartilaginous tissue. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 314, 157–165. doi: 10.1002/jez.b.21322
- Oulion, S., Debiais-Thibaud, M., D'Aubenton-Carafa, Y., Thermes, C., Da Silva, C., Bernard-Samain, S., et al. (2010). Evolution of Hox gene clusters in gnathostomes: insights from a survey of a shark (*Scyliorhinus canicula*) transcriptome. *Mol. Biol. Evol.* 27, 2829–2838. doi: 10.1093/molbev/msq172
- Peignoux-Deville, J., Lallier, F., and Vidal, B. (1982). Evidence for the presence of osseous tissue in dogfish vertebrae. *Cell Tissue Res.* 222, 605–614. doi: 10.1007/BF00213858
- Porter, M. E., Koob, T. J., and Summers, A. P. (2007). The contribution of mineral to the material properties of vertebral cartilage from the smooth-hound shark *Mustelus californicus*. *J. Exp. Biol.* 210, 3319–3327. doi: 10.1242/jeb.006189
- Ramlochansingh, C., Branoner, F., Chagnaud, B. P., and Straka, H. (2014). Efficacy of tricaine methanesulfonate (MS-222) as an anesthetic agent for blocking sensory-motor responses in *Xenopus laevis* tadpoles. *PLoS ONE* 9:e101606. doi: 10.1371/journal.pone.0101606
- Reynolds, S. H. (ed.). (1897). *The Vertebrate Skeleton*. Cambridge Zoological Series. Cambridge: Cambridge University Press.
- Rychel, A. L., and Swalla, B. J. (2007). Development and evolution of chordate cartilage. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 308, 325–335. doi: 10.1002/jez.b.21157
- Ryll, B., Sanchez, S., Haitina, T., Tafforeau, P., and Ahlberg, P. E. (2014). The genome of *Callorhynchus* and the fossil record: a new perspective on SCPP gene evolution in gnathostomes. *Evol. Dev.* 16, 123–124. doi: 10.1111/ede.12071
- Sanchez, S., Dupret, V., Tafforeau, P., Trinajstić, K. M., Ryll, B., Gouttenoire, P. J., et al. (2013). 3D microstructural architecture of muscle attachments in extant and fossil vertebrates revealed by synchrotron microtomography. *PLoS ONE* 8:e56992. doi: 10.1371/journal.pone.0056992
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Veis, A., and Dorvee, J. R. (2013). Biomineralization mechanisms: a new paradigm for crystal nucleation in organic matrices. *Calcif. Tissue Int.* 93, 307–315. doi: 10.1007/s00223-012-9678-2
- Wada, H., Okuyama, M., Satoh, N., and Zhang, S. (2006). Molecular evolution of fibrillar collagen in chordates, with implications for the evolution of vertebrate skeletons and chordate phylogeny. *Evol. Dev.* 8, 370–377. doi: 10.1111/j.1525-142X.2006.00109.x
- Yamamoto, M., Morita, R., Mizoguchi, T., Matsuo, H., Isoda, M., Ishitani, T., et al. (2010). Mib-1/Notch signalling regulates patterning and structural roles of the notochord by controlling cell-fate decisions. *Development* 137, 2527–2537. doi: 10.1242/dev.051011
- Zangerl, R. (ed.). (1981). *Chondrichthyes I: Paleozoic Elasmobranchii (Handbook of Paleichthyology)*. Stuttgart: G. Fischer.
- Zhang, G., and Cohn, M. J. (2006). Hagfish and lancelet fibrillar collagens reveal that type II collagen-based cartilage evolved in stem vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 16829–16833. doi: 10.1073/pnas.0605630103
- Zhang, G., and Cohn, M. J. (2008). Genome duplication and the origin of the vertebrate skeleton. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 387–393. doi: 10.1016/j.gde.2008.07.009
- Zhang, G., Eames, B. F., and Cohn, M. J. (2009). Chapter 2. Evolution of vertebrate cartilage development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 86, 15–42. doi: 10.1016/S0070-2153(09)01002-3
- Zhang, G., Miyamoto, M. M., and Cohn, M. J. (2006). Lamprey type II collagen and Sox9 reveal an ancient origin of the vertebrate collagenous skeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 3180–3185. doi: 10.1073/pnas.0508313103

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Enault, Muñoz, Silva, Borday-Birraux, Bonade, Oulion, Ventéo, Marcellini and Debiais-Thibaud. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Sixième partie .

Conclusion et perspectives

23. Données paléontologiques et développementales

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail illustre la diversité morphologique existant au sein des tissus minéralisés des néosélaciens, que ce soit au niveau du squelette dermique ou de l'endosquelette. Les caractéristiques microstructurales de l'émailloïde ont pourtant longtemps été utilisées dans un cadre systématique compte tenu de leur microstructure complexe, considérée comme remarquablement stable à l'échelle du groupe, et ce malgré les indices suggérant l'existence d'une variation. Cette stabilité est bien réelle chez les sélachimorphes, dont tous les représentants partagent la même microstructure dentaire indépendamment de leurs relations intra-ordinales, de leur morphologie dentaire et de leur régime alimentaire, ce qui suggère un signal phylogénétique marqué. Les raies présentent en revanche une microstructure dentaire beaucoup plus variable, notamment les Rajiformes, qui présentent un véritable continuum morphologique entre des microstructures totalement dépourvues d'organisation et d'autres beaucoup plus complexes, sans qu'il soit possible de le corrélérer de manière univoque aux relations phylogénétiques au sein du groupe, à la morphologie dentaire ou encore au régime alimentaire de ces espèces.

La microstructure dentaire des Myliobatiformes est en revanche beaucoup plus stable puisqu'elle est partagée par tous les membres du groupe, indépendamment des facteurs écologiques, pourtant très marqués chez ce clade. La stabilité des microstructures dentaires au sein des sélachimorphes et des myliobatiformes est très prometteuse et suggère que les caractères microstructuraux sont potentiellement informatifs, à condition de bien identifier les limites de la variation de ces tissus chez les groupes d'intérêt, en particulier chez les formes actuelles, avant de considérer les taxons connus exclusivement à l'état fossile. Ces observations soulignent également les limitations des hypothèses adaptatives,

23. Données paléontologiques et développementales

invoquées pour expliquer les données très limitées existant chez les batoïdes avant ces travaux. Ce type d'hypothèse est risqué, en particulier si on considère les connaissances très limitées qui sont disponibles sur l'écologie de nombreuses espèces.

Les modalités développementales de cette variation, et notamment des différences importantes existant entre la microstructure dentaire des sélachimorphes et celle des batoïdes demeurent encore difficiles à cerner, et des travaux supplémentaires seront nécessaires pour en comprendre les mécanismes. Plusieurs différences ont déjà pu être mises en évidence sur la base de critères histologiques et ultrastructuraux au cours du développement dentaire de ces deux groupes, bien que leur implication dans les différentes microstructures décrites ne soit pas encore bien établie. En se basant sur la littérature existante (e.g. Sasagawa, 2002a), il semble que si la nucléation des cristaux de fluoroapatite puisse effectivement être conditionnée par l'orientation de la trame organique (indépendamment de sa composition) chez les requins et certaines raies, ce n'est pas le cas chez les Myliobatiformes. On peut donc émettre l'hypothèse que les variations de microstructure documentées chez ces groupes résultent plus de la régulation du processus de nucléation des cristallites que celle de la trame organique du tissu. L'approche par hybridation *in situ*, pour le moment limitée à la petite roussette devra être étendue à d'autres chondrichthyens pour disposer de données comparatives. La prochaine étape sera naturellement de vérifier les patrons d'expression des gènes examinés dans la quatrième partie chez *Raja clavata*, chez qui les séquences des collagènes et des SPARCs ont déjà été identifiées.

A terme, il faudrait également vérifier les patrons d'expression de ces gènes (et d'autres familles de gènes présentant un intérêt potentiel : les MMP par exemple), dans la dentition en développement de représentants issus des Torpediniformes et des Myliobatiformes afin de couvrir la diversité de microstructures dentaires décrites chez les batomorphes. La reproduction ovovivipare de ces espèces (Conrath & Musick, 2012), le mode de vie pélagique de certaines formes et le peu de données génomiques disponibles pour ces groupes complique toutefois considérablement cette perspective à l'heure actuelle. Une approche préliminaire envisageable serait de i) réaliser une comparaison rigoureuse à l'échelle ultrastructurale des matrices de l'émailloïde et de la dentine à différents stades de synthèse et de calcification chez ces différents groupes, et ii) séquencer les gènes codant pour les protéines présentes dans la matrice de l'émailloïde avant la formation de la dentine, puis au cours de la minéralisation du tissu. Cette approche, systématiquement réalisée dans

23. Données paléontologiques et développementales

un cadre comparatif incluant une ou deux espèces de requins (un carcharhiniforme et un squaliforme par exemple) et des représentants issus des grands clades de batoïdes, à différents stades du développement dentaire, permettrait potentiellement de cibler les éléments susceptibles de contribuer aux grandes différences de microstructures existant entre ces groupes.

Dans tous les cas, les observations réalisées dans la quatrième partie permettent difficilement d'interpréter l'émailloïde des chondrichthyens uniquement comme une forme de dentine hyperminéralisée compte tenu de sa matrice beaucoup plus pauvre en fibres de collagène et de la présence de ces « fibres géantes », absentes dans la matrice de la dentine.

23.1. Chondrichthyens non-néosélaciens

Une telle approche ne permet cependant que de raisonner à l'échelle des néosélaciens, qui ne constituent finalement qu'une partie de la diversité des chondrichthyens et une branche relativement récente du groupe en termes évolutifs. Il sera donc nécessaire de prendre en compte les chimères afin de pouvoir réaliser des inférences évolutives sur l'histoire de ce tissu à l'échelle des chondrichthyens. La nature des tissus dentaires de ces dernières semble toutefois particulièrement problématique et ils sont interprétés de manière variable dans la littérature : la plus grande partie des plaques dentaires serait constituée d'ostéodentine (Orvig, 1967), elle-même traversée par de la dentine tubulaire (Moy-Thomas, 1939), de la pléromine (Orvig, 1967) ou encore de la dentine « orthotrabéculaire » (Zangerl et al., 1993), constituant la partie hyperminéralisée de la dentition. Gillis & Donoghue (2007) décrivent en revanche une couche d'émailloïde tout à fait comparable à celle de nombreux élasmobranches dans les plaques dentaires d'*Helodus*, un holocéphale du Carbonifère.

Quelques travaux (Ishiyama et al., 1984, 1991) ont permis de décrire la microstructure, l'ultrastructure et la composition minéralogique de la pléromine chez deux représentants de chimères actuelles, *Chimaera fantasma* et *Hydrolagus* sp. Leurs résultats indiquent que ce tissu présente un certain nombre de différences fondamentales avec l'émailloïde des néosélaciens : il est constitué de whitlockite, une forme plus rare de phosphate de calcium que l'hydroxyapatite et sa microstructure est caractérisée par une agrégation de

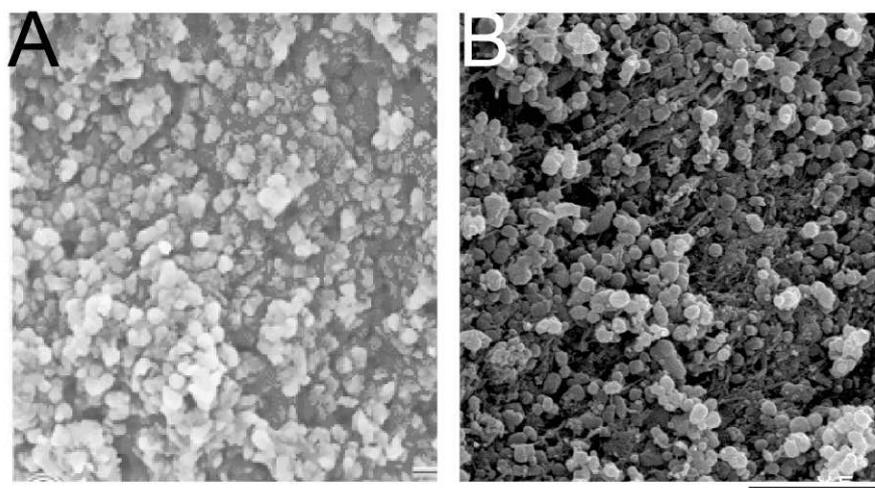


FIGURE 51. – Pléromine et artefact : **A** : microstructure de la pléromine de *Chimaera fantasma*, d'après Ishiyama et al. (1991). **B** : artefact dans la dentine de *Dasyatis margarita*. Échelle : 5 μm .

cristaux sphéroïdes de grande taille (figure 51-A). Une morphologie virtuellement identique a toutefois été observée dans l'orthodentine de quelques rares néosélaciens, dont la plupart des dents échantillonnées étaient totalement dépourvue de cette structure (figure 51-B). Ce résultat laisse à penser qu'une telle microstructure résulte sans doute d'un artefact de préparation, peut-être lié à l'attaque acide des tissus dentaires. Malgré ces différences, certaines similarités ont été mises en évidence entre la formation de la pléromine et de l'émailloïde à l'échelle ultrastructurale (Sasagawa & Akai, 1992), et ces auteurs suggèrent également que les mécanismes de calcification du tissu soient plus similaires entre les holocéphales et les néosélaciens, malgré la morphologie bien distincte des tissus fonctionnels, qu'entre l'émailloïde des néosélaciens et celui des actinoptérygiens.

L'histologie dentaire des groupes fossiles apparentés aux chimères est tout aussi problématique comme en atteste la multitude de noms donnés aux tissus hyperminéralisés de leur représentants (émail (Nielsen, 1932), dentine tubulaire (Moy-Thomas, 1939), pétrodentine (Lison, 1941), ostéodentine (Radinsky, 1961), émailloïde (Lund, 1983) ou encore décoronoïne (Bendix-almgreen, 1983)). Dans un premier temps, il sera donc crucial d'examiner la microstructure dentaire d'un nombre suffisant de formes pour couvrir ces groupes (pétalodontiformes, eugénéodontiformes, orodontiformes), mais également les morphologies dentaires les plus spécialisées au sein de ces groupes. Si l'histologie dentaire des chondrichthyens paléozoïques a déjà été étudiée de manière plus ou moins détaillée (e.g. Phoeodontiformes : Ivanov, 2000 ; Eugeneodontiformes : Bendix-Almgreen,

23. Données paléontologiques et développementales

1966; Nielsen, 1932, 1952; Petalodontiformes : Hampe, 1991; Zangerl et al., 1993), elle a cependant été abordée avec des approches techniques variées, ce qui ne permet pas toujours de systématiser les observations réalisées. A ceci s'ajoute également le problème de la préservation du matériel paléozoïque, parfois très abimé et sujet à des phénomènes de recristallisation, ce qui complique considérablement l'observation des tissus.

La description approfondie des tissus dentaires chez ces groupes, mais également chez les chimères actuelles (où elle peut être réalisée à l'échelle ultrastructurale, microstructurale et cellulaire au cours du développement embryonnaire) pourrait ainsi permettre, par comparaison avec les données existant chez les néosélaciens, de mieux comprendre les relations évolutives existant entre leurs tissus dentaires respectifs et de déterminer les modalités d'apparition de la pléromine dans le registre fossile des euchondrocéphales. Le génome complet de *Callorhinchus* étant disponible depuis peu, les gènes examinés chez les néosélaciens pourraient également être isolés afin d'examiner leurs patrons d'expression dans la dentition, les denticules dermiques et les aiguillons de cette espèce, ces derniers étant recouvert d'une fine couche d'émailloïde (Jerve et al., 2014), ce qui peut permettre de comparer le développement de ces tissus au sein d'un même organisme. Ces résultats permettraient ainsi de mieux décrire l'évolution des caractéristiques structurales et moléculaires des tissus hyperminéralisés chez les chondrichthyens.

23.2. L'émailloïde chez les actinoptérygiens

La répartition très large de l'émailloïde dans la phylogénie des vertébrés permet également d'envisager la comparaison des données paléontologiques et développementales obtenues chez les chondrichthyens avec ce qui est connu actuellement chez les actinoptérygiens. La dentition de nombreux actinoptérygiens présente deux types de tissus hyperminéralisés : un capuchon d'émailloïde, couramment appelé acrodine (ou *cap enameloid*) (Poole, 1967; Orvig, 1978) dont la base est encerclée par une bande de ganoïne (*collar enamel*), un tissu homologue avec l'émail qui recouvre également le squelette dermique des polyptères et des lépisostées (Qu et al., 2015; Sasagawa et al., 2013; Sire et al., 2009). La ganoïne a disparu secondairement du squelette dermique et de la dentition de la plupart des téléostéens.

La question des relations évolutives existant entre l'émailloïde des actinoptérygiens et ce-

23. Données paléontologiques et développementales

lui des chondrichthyens est toujours débattue. Les différences de matrice extra-cellulaire, plus riche en collagène chez les actinoptérygiens que chez les chondrichthyens (Huyseune & Sire, 1998; Probst & Skobe, 1986; Probst et al., 1993; Sasagawa, 1993; Shellis & Miles, 1974) et des patrons de minéralisation de l'émailloïde chez ces groupes (elle débute à la jonction émailloïde/dentine chez les actinoptérygiens tandis qu'elle est plus diffuse chez les chondrichthyens) (Risnes, 1990; Sasagawa, 1998, 2002c) ont mené plusieurs auteurs à considérer l'acrodine et l'émailloïde comme le produit d'une convergence évolutive (Moss, 1977; Sasagawa, 2002c). L'absence d'émailloïde dans les dents et les écailles de certains des premiers chondrichthyens connus, tels que *Cladoselache*, *Holmesella*, *Xenacanthus* et *Adamantina* (Bendix-Almgreen, 1993, 1994; Dean, 1909; Orvig, 1966) et chez certains actinoptérygiens comme *Cheirolepis* ou *Psarolepis* (ce dernier étant peut être un sarcoptérygien) (Qu et al., 2015; Smith, 1992) sont également en faveur d'une convergence de l'émailloïde chez les chondrichthyens et les actinoptérygiens.

De l'acrodine est en revanche présente dans les dents d'*Andreolepis*, un des plus anciens actinoptérygiens connu (Janvier, 1978), et les données paléontologiques mentionnées ci-dessus ont été considérées comme trop anecdotiques pour constituer un argument en faveur de la convergence de l'émailloïde chez ces deux groupes par Gillis & Donoghue (2007). La présence potentielle d'émailloïde chez certains euchondrocéphales a également été avancé comme argument pour soutenir l'hypothèse que l'émailloïde présent sur les dents et autres structures odontoïdes des chondrichthyens et des actinoptérygiens est hérité d'un ancêtre commun (Gillis & Donoghue, 2007; Orvig, 1985). Les différences de matrice et de minéralisation observées chez les chondrichthyens et les actinoptérygiens seraient alors le produit de divergences propres aux deux groupes (Gillis & Donoghue, 2007).

D'un point de vue morphologique, la microstructure de l'émailloïde de certains téléostéens présente des ressemblances frappantes avec les structures décrites chez les néosélaciens (figure 52), ce qui a également été interprété comme un phénomène de convergence par certains auteurs (Reif, 1979; Shellis & Berkovitz, 1976). La figure 52-A illustre la microstructure d'un piranha fossile qui est extrêmement similaire à celle d'un sélachimorphe. La microstructure dentaire d'un autre characiforme, probablement attribuable au genre *Collossoma*, rappelle en revanche les observations réalisées chez certains rajiformes (Ptychotrygonidae en particulier) (figure 52-B). Cet exemple est intéressant dans

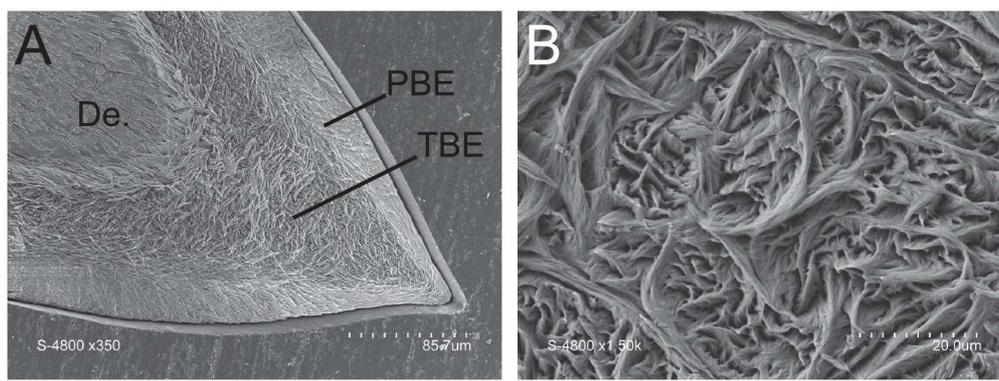


FIGURE 52. – Microstructure de l'émailloïde de Characiformes fossiles. **A** : Serrasalminae. Échelle : 80 µm. **B** : « *Colossoma* sp. ». Section longitudinale de la couronne. Échelle : 20 µm.

la mesure où ces deux taxons, phylogénétiquement proches, présentent des morphologies dentaires très différentes : un type coupeur (Serrasalminae) et une morphologie dentaire correspondant d'avantage à un type dentaire écraseur (*Colossoma*). Ces observations laissent supposer que la microstructure dentaire de ces groupes est moins stable que ce qui est décrit chez les requins par exemple, et qu'elle ne reflète pas l'histoire évolutive du groupe.

Les données d'expression de gènes obtenues au cours de ce travail sont congruentes avec les données microstructurales et suggèrent que des différences majeures existent bien entre l'émailloïde des chondrichthyens et celui des actinoptérygiens. En effet, chez les téléostéens, le collagène de type I et *SPARC* sont co-exprimés dans les odontoblastes et dans les améloblastes (Kawasaki et al., 2005; Kawasaki, 2009a), ce qui est également le cas chez les stades larvaires de *Pleurodeles waltl*, un urodèle (Assaraf-Weill et al., 2014). L'expression de ces gènes chez *Scyliorhinus* est en revanche limitée aux odontoblastes, ce qui correspond aux données connues chez les mammifères (Andujar et al., 1991). Ces données soutiennent l'hypothèse que l'émailloïde au sens large désigne un ensemble de tissus probablement convergents chez les chondrichthyens et chez les ostéichthyens qui en possèdent. Dans ce contexte l'étude de la transition entre les deux tissus au cours de la métamorphose des urodèles ne peut pas être considérée comme reflétant un processus évolutif ayant eu lieu à l'échelle des vertébrés mais plus probablement comme un processus propre aux amphibiens.

La mise en évidence récente de gènes de la famille des SCPPs dont certains codent pour des EMP, dans le génome du lépisostée tacheté (*Lepisosteus oculatus*) (Qu et al., 2015),

23. Données paléontologiques et développementales

jusque-là inconnus chez les actinoptérygiens, permet également d'envisager l'hypothèse que certains de ces gènes puissent être impliqués dans la formation de l'acrodine chez ces formes. Bien que ne faisant pas partie des EMP, *ODAM*, un gène appartenant à la famille SCPP et codant pour une protéine impliquée dans la maturation des tissus hyperminéralisés, présente des patrons d'expression comparables chez les tétrapodes et chez les téléostéens. Ces résultats ont conduit Kawasaki (2009a; 2013) à émettre l'hypothèse d'un programme de minéralisation partagé au sein des ostéichthyens et commun aussi bien à l'émail (ou ganoïne) qu'à l'acrodine. L'absence probable de SCPP du génome des chondrichthyens exclut *a priori* le partage d'un tel programme avec les ostéichthyens, ce qui signifie que la minéralisation de l'émailloïde des sélaciens diffère également de l'émailloïde des actinotérygiens d'un point de vue moléculaire. Compte tenu des différences existant non seulement dans la matrice de l'émailloïde mais également dans le processus de minéralisation de celle-ci, il est donc fortement probable que ces tissus soient convergents chez les chondrichthyens et les ostéichthyens. Il sera cependant nécessaire d'examiner non seulement les patrons d'expression des autres collagènes fibrillaires et de *SPARC-Like* chez les actinoptérygiens afin de pouvoir les comparer avec les données de la petite roussette, mais également ceux des EMP au cours du développement dentaire de *Lepisosteus* afin de déterminer s'ils sont impliqués ou non dans la formation de l'acrodine. L'obtention de ces résultats pourrait ainsi permettre de statuer plus précisément sur les relations évolutives existant entre ces tissus.

24. Diversité du squelette des chondrichthyens

Si le squelette cartilagineux des chondrichthyens peut être considéré *a priori* comme une structure plus simple que le squelette osseux des ostéichthyens, il est pourtant caractérisé par une variation morphologique et structurelle considérable (Dean & Summers, 2006). D'un point de vue morphologique, le squelette crânien (suspension des mâchoires, organisation des arcs branchiaux (Dean et al., 2007; Gillis et al., 2009b, 2011; Kolmann et al., 2014; Maisey, 1980), axial (synarcual (Claeson, 2011; Johanson et al., 2013, 2015)) et appendiculaire (morphologie des nageoires pectorales (Claeson & Dean, 2011; Compagno, 1999)) sont connus pour varier de manière importante entre les différents groupes de chondrichthyens.

La mise en place (et éventuellement la calcification) de ces différentes structures squelettiques au cours du développement embryonnaire demeure mal connue d'un point de vue morphologique, et la plupart des descriptions sont issues de travaux relativement anciens (e.g. de Beer, 1931; Parker, 1878). Une première étape vers une meilleure compréhension de l'origine de cette diversité consisterait donc à réaliser une description rigoureuse de la squelettogénèse chez plusieurs chondrichthyens de manière à couvrir la diversité actuelle du groupe, en ciblant les taxons présentant les morphologies les plus spécialisées. Dans ce contexte, la petite roussette constitue certainement une espèce « non-modèle » idéale pour aborder des thématiques liées au développement du squelette au sens large chez les chondrichthyens. Cependant, compte tenu de la diversité qui caractérise les structures et les tissus du squelette des chondrichthyens, l'utilisation du genre *Scyliorhinus* comme modèle unique pour ce groupe n'est pas exempt de limitations et ne permet pas de couvrir l'ensemble des pièces squelettiques existant chez les chondrichthyens.

La diversité de ces pièces squelettiques suggère également des séquences de calcification

24. Diversité du squelette des chondrichthyens

variables au sein des chondrichthyens, ce qui est illustré par la figure 53. Celle-ci présente quelques données préliminaires concernant la calcification du squelette de plusieurs espèces de chondrichthyens à des stades développementaux proches.

Le genre *Chimaera* est représenté par un stade récemment éclos, et les denticules dermiques sont encore présents sur la surface dorsale (figure 53-A, A'). Le squelette est très peu minéralisé et les seuls éléments détectables en microtomographie en plus des denticules dermiques sont les plaques dentaires et l'aiguillon dorsal. Aucun élément du squelette axial et du squelette appendiculaire n'est visible. Chez les néosélaciens le squelette de l'embryon de *Squatina* (figure 53-B, B') apparaît au contraire déjà très minéralisé. Le cartilage de Meckel et le palatocarré sont bien visibles, ainsi que certaines parties du squelette crânien et du squelette branchial. Le scapulocoracoïde est également visible, et le squelette axial est bien minéralisé. A la différence de la roussette, seuls les centres vertébraux semblent calcifiés à ce stade, et les arcs neuraux, pourtant la première structure du squelette axial à se minéraliser chez *Scyliorhinus*, ne sont pas détectés. Le squelette de l'embryon de *Raja* est encore plus minéralisé (figure 53-C, C'), et la plupart du squelette crânien, axial et appendiculaire sont visibles. Seul le squelette branchial n'est pas détecté.

Cet échantillonnage réduit au sein des chondrichthyens montre déjà des combinaisons de tissus calcifiés très différentes de ce qui a été décrit chez *Scyliorhinus* (figure 53-D', D') dans la cinquième partie. Si ces données ne permettent pas de discuter des séquences de minéralisation propres à ces différentes espèces il est évident qu'elles diffèrent les unes des autres, ce qui est bien illustré par l'absence de détection des arcs neuraux chez *Squatina*, mais également des denticules dermiques, qui ne sont pas visibles alors qu'ils sont bien développés chez *Scyliorhinus*. Ces données indiquent qu'il est nécessaire de s'intéresser à la variation des éléments squelettiques (que ce soit en termes de développement, de calcification ou de morphologie) au sein des sélachimorphes dans un premier temps, avant d'y adjoindre des données sur la squelettogénèse des raies et des chimères. Une première phase de description rigoureuse de la squelettogénèse de plusieurs espèces choisies pour couvrir un maximum de diversité morphologique pourra de plus certainement permettre de considérer des aspects fonctionnels et adaptatifs des structures squelettiques comme la corrélation potentielle existant entre la séquence de minéralisation du squelette et certaines caractéristiques de celui-ci. De nombreuses espèces présentent par exemple

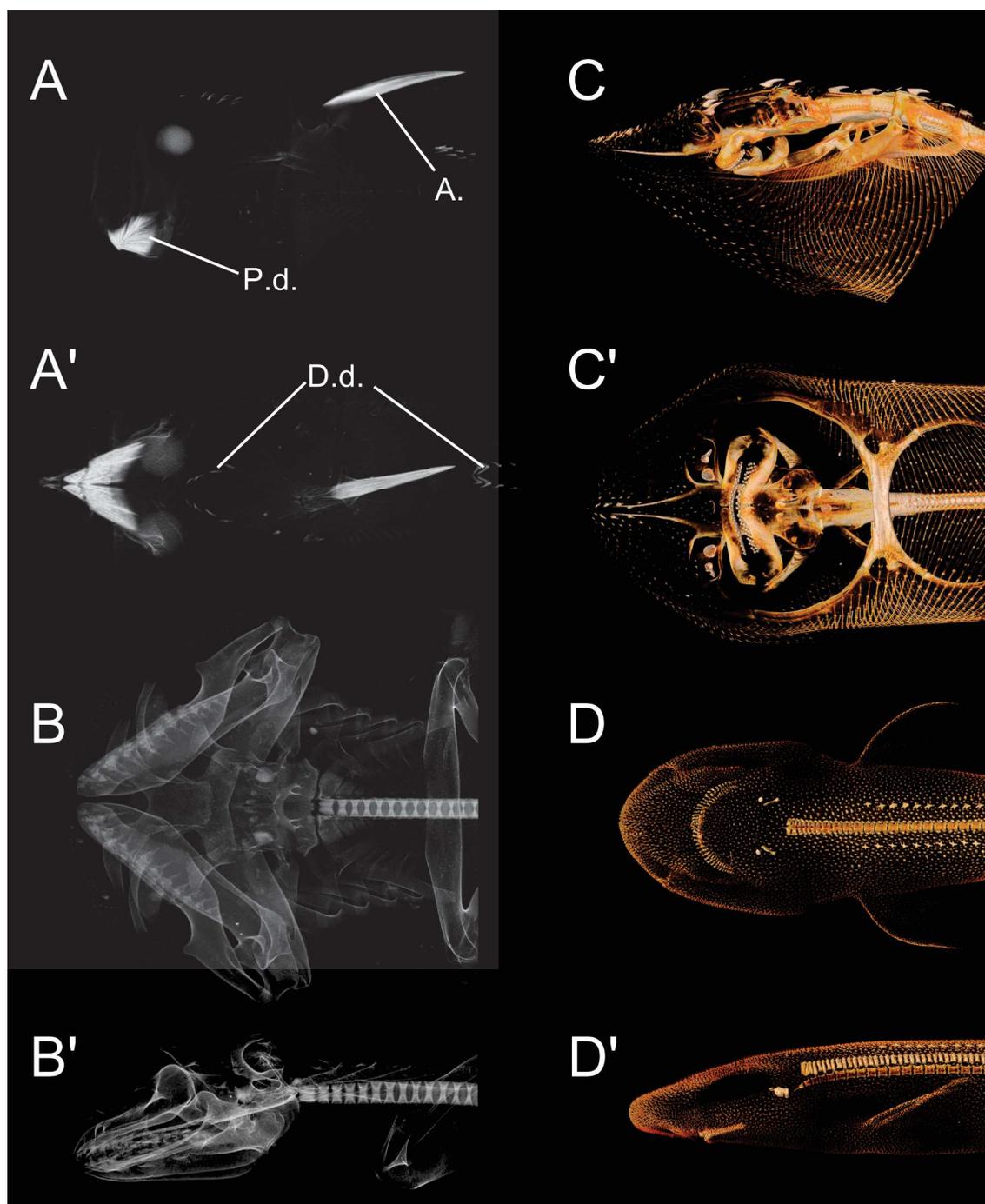


FIGURE 53. – Visualisation du squelette de plusieurs espèces de chondrichthyens par microtomographie à rayons-X. **A** : *Chimaera* sp., individu éclos (14 cm), vue latérale. **A'** : Vue ventrale. **B** : embryon de *Squatina* sp. (19,5 cm), vue ventrale. Spécimen BMNH 1905.3.28.13 scanné par Zérina Johanson, BMNH. **B'** : vue latérale. **C** : embryon de *Raja clavata*, stade 33 (14 cm), vue latérale. **C'** : vue ventrale. **D** : embryon de *S. canicula* à l'éclosion (10 cm), vue ventrale. **D'** : vue latérale.

24. Diversité du squelette des chondrichthyens

plusieurs couches de tesserae dans les zones du squelette soumises à un stress mécanique important (Dingerkus et al., 1991). Les ceintures des espèces benthiques, illustrées ici par *Squatina* et *Raja*, semble également se calcifier de manière forte au cours du développement embryonnaire, ce qui est probablement lié à l'élargissement marqué des nageoires pectorales.

Reste à contourner les problèmes liés à l'approche technique utilisée ici : si la microtomographie permet de mettre en évidence les structures calcifiées de manière satisfaisante, elle ne permet en revanche pas de décrire la mise en place des différentes pièces squelettiques au cours du développement embryonnaire. Une alternative idéale pour pallier à ce problème serait l'utilisation d'un synchrotron, mais considérant le coût élevé de cette technique, il semble plus raisonnable d'envisager une approche mixte basée à la fois sur la microtomographie classique et sur des doubles marquages alcian-alizarine, d'autant que ces techniques peuvent être appliquées conjointement sur les mêmes spécimens.

Bien que le génome complet de *Scyliorhinus* ne soit pas encore séquencé, de nombreuses données génomiques sont toutefois déjà disponibles, que ce soit pour *S. canicula*, ou *S. torazame*, une espèce asiatique proche. L'accès à ces données a notamment permis de mettre en évidence que les différents types de calcification décrits chez les chondrichthyens se produisent dans des contextes moléculaires distincts. Ce type d'approche (par hybridation *in situ*) reste cependant encore tributaire de la disponibilité de données génomiques, toujours très restreintes à l'échelle des chondrichthyens. Le seul chondrichthyen pour lequel un génome complet est disponible à ce jour est la chimère éléphant (*Callorhynchus milii*), principalement sélectionnée pour la taille réduite de son génome (Venkatesh et al., 2005).

Il est toutefois légitime de se demander si cette espèce représente un choix pertinent à l'échelle des chondrichthyens, en tout cas en ce qui concerne les tissus minéralisés. Sans compter sa répartition géographique (limitée au sud de l'Océanie) et les difficultés relatives à son élevage et à sa reproduction en captivité (Boisvert et al., 2014) qui rendent l'obtention de matériel biologique particulièrement difficiles, les chimères présentent des caractères squelettiques très dérivés comparé aux autres chondrichthyens. En plus de leurs plaques dentaires à croissance continue (Didier et al., 1994; Didier, 1995), figurées dans l'introduction de ce travail (figure 5-F), elles sont en effet caractérisées par un squelette dermique particulièrement réduit, limité à quelques denticules répartis sur la

24. Diversité du squelette des chondrichthyens

surface dorsale des embryons (figure 53-A, A') et qui sont perdus peu de temps après l'éclosion (Didier et al., 2012). Leur squelette axial est également assez différent de celui des sélaciens étant donné qu'il est dépourvu de centres vertébraux. Les éléments dorsaux et ventraux sont rudimentaires et la gaine de la notochorde est parcourue d'anneaux calcifiés dont le nombre augmente avec l'âge de l'animal (Didier et al., 2012). Il serait intéressant de déterminer l'environnement moléculaire dans lequel cette calcification se produit, ce qui pourrait ensuite être comparé aux données générées sur la calcification des structures vertébrales chez la petite roussette. Cette approche pourrait ainsi permettre de préciser si les mécanismes de calcification de l'axe vertébral sont homologues chez ces groupes, ou s'il s'agit d'un nouveau type de calcification ayant évolué indépendamment au sein des holocéphales. La calcification prismatique, propre aux chondrichthyens, est de plus très réduite chez les chimères actuelles, alors qu'elle est bien documentée chez les formes fossiles (Finarelli & Coates, 2014; Grogan & Lund, 2000). Ce type de calcification, bien que très variable d'un point de vue morphologique et topographique, n'a pourtant pas encore été étudié dans un contexte systématique et évolutif chez les chondrichthyens, ce qui devra être réalisé avant de s'intéresser aux modalités liées à sa réduction chez les chimères actuelles.

Malgré les différentes modalités de calcification des pièces cartilagineuses mises en évidence chez la petite roussette, la présence potentielle de cellules osseuses dans les arcs neuraux reste une question très débattue. Les données d'expression de collagène et les données ultrastructurales discutées dans la quatrième partie permettent d'argumenter en faveur de la ressemblance importante existant entre le tissu des arcs neuraux et du tissu osseux d'un point de vue ultrastructural (figure 50) histologique (cellules enfermées dans une matrice calcifiée) et moléculaire (expression de collagène de type I). Dans la mesure où il est clairement établi que la perte d'ossification dermique est un état de caractère dérivé chez les chondrichthyens, on peut émettre l'hypothèse que la perte de l'ossification périchondrale au cours de l'évolution des chondrichthyens ne serait que partielle et aurait persisté chez certains représentants du groupe, tels que *S. canicula*. Cette hypothèse est difficile à évaluer étant donné que les éléments vertébraux de la plupart des néosélaciens sont souvent recouverts par de la calcification de type prismatique. Alternativement, ce type de calcification peut également représenter une innovation tardive et propre aux Scyliorhinidae (et peut être d'autres chondrichthyens). La première chose à faire pour

24. *Diversité du squelette des chondrichthyens*

répondre à cette question sera de décrire la calcification des arcs neuraux au sein l'un large échantillonnage de chondrichthyens afin d'établir la prévalence de ce type de tissu au sein du groupe.

Compte tenu de la richesse et la diversité des chondrichthyens en termes de morphologie, de stratégies reproductives ou de spécialisations écologiques, il sera de toute manière indispensable de mieux caractériser la diversité de leur système squelettique et sa mise en place au cours du développement embryonnaire, et ce à différentes échelles d'analyse, avant d'envisager de replacer ces données dans un contexte comparatif à plus large échelle taxonomique, celle des gnathostomes.

Bibliographie

- Adnet, S ; Cappetta, H ; Guinot, G ; Notarbartolo, G, 2012. Evolutionary history of the devilrays (Chondrichthyes : Myliobatiformes) from fossil and morphological inference. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 166 :132–159.
- Agassiz, L, 1833. *Recherches sur les poissons fossiles*. Petitpierre, Neuchatel.
- Alberts, B ; Johnson, A ; Lewis, J ; Raff, M ; Roberts, K ; Walter, P, 2002. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York, 4th edition.
- Albertson, RC ; Yan, YL ; Titus, TA ; Pisano, E ; Vacchi, M ; Yelick, PC ; Detrich, HW ; Postlethwait, JH, 2010. Molecular pedomorphism underlies craniofacial skeletal evolution in Antarctic notothenioid fishes. *BMC Evolutionary Biology*, 10 :4.
- Aldridge, RJ ; Briggs, DEG ; Smith, MP ; Clarkson, ENK ; Clark, NDL, 1993. The anatomy of conodonts. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, 340 :405–421.
- Andreev, PS ; Cuny, G, 2012. New Triassic stem selachimorphs (Chondrichthyes, Elasmobranchii) and their bearing on the evolution of dental enameloid in Neoselachii. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 32 :255–266.
- Andujar, MB ; Couble, P ; Couble, ML ; Magloire, H, 1991. Differential expression of type I and type III collagen genes during tooth development. *Development*, 111 :691–698.
- Arambourg, C, 1940. Le groupe des Ganopristinés. *Bulletin de la Société géologique de France*, 10 :127–147.
- Arana-Chavez, VE ; Massa, LF, 2004. Odontoblasts : the cells forming and maintaining dentine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36 :1367–1373.
- Arends, J ; Jongebloed, WL ; Schuthof, J, 1983. The ultrastructure of surface enamel in

Bibliographie

- relation to de-and remineralization. In SA Leach ; WM Edgar, eds., *Demineralization and Remineralization of the Teeth*. IRL Press, Oxford, 155–163.
- Arendt, E, 1822. De capitis ossei Esocis lucii structura singulari : dissertatio inauguralis zootomica.
- Arnason, U ; Gullberg, A ; Janke, A, 2001. Molecular phylogenetics of gnathostomous (jawed) fishes : old bones, new cartilage. *Zoologica Scripta*, 30 :249–255.
- Aschliman, NC ; Nishida, M ; Miya, M ; Inoue, JG ; Rosana, KM ; Naylor, GJP, 2012. Body plan convergence in the evolution of skates and rays (Chondrichthyes : Batoidea). *Molecular phylogenetics and evolution*, 63 :28–42.
- Assaraf-Weill, N ; Gasse, B ; Silvent, J ; Bardet, C ; Sire, JY ; Davit-Béal, T, 2014. Ameloblasts express type I collagen during amelogenesis. *Journal of dental research*, 93 :502–7. ISSN 1544-0591. doi :10.1177/0022034514526236.
- Balfour, FM, 1878. *A monograph on the development of elasmobranch fishes*. Macmillan, London . doi :10.5962/bhl.title.7847.
- Ballard, W ; Jean, M ; Lechenault, H, 1993. A series of normal stages for development of scyliorhinus canicula, the lesser spotted dogfish (Chondrichthyes, Scyliorhinidae). *Journal of Experimental Zoology*, 267 :318–336.
- Bauer, WH, 1943. Histogenesis of the so-called secondary enamel cuticle and dental cuticle. *American Journal of Orthodontics and Oral Surgery*, 29 :626–634.
- de Beer, GR, 1931. The development of the skull of Scyllium (Scyliorhinus) canicula L. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 74 :591–652.
- Belleggia, M ; Figueroa, DE ; Bremec, C, 2014. The dentition of the narrownose smooth-hound shark, *Mustelus schmitti*. *Marine and Freshwater Research*, 65 :688–696.
- Bendix-Almgreen, SE, 1966. New investigations on *Helicoprion* from the Phosphoria Formation of south-east Idaho, U.S.A. *Biologiske Skrifter udgivet af det Kongelige Danske Videnskabernes Selskab*, 14 :1–54.
- Bendix-almgreen, SE, 1983. *Carcharodon megalodon* from the Upper Miocene of Denmark , with comments on elasmobranch tooth enameloid : coronoin. *Bulletin of the Geological Society of Denmark*, 32 :1–32.

Bibliographie

- Bendix-Almgreen, SE, 1993. *Adamantina benedictae* n. g. et sp. - en nyhed fra Ostgrønlands marine ovre Perm. In O Johnsen, ed., *Geologisk Museum - 100 år på oiter vold*. Københavns Universitet. Geologisk Museum, (Rodos), København, 48658.
- Bendix-Almgreen, SE, 1994. *Adamantina benedictae* n.g. et sp. - a new elasmobranch from the marine Upper Permian of East Greenland. *Ichthyolith Issues*, 14 :21–22.
- Benton, M; Donoghue, PCJ; Asher, RJ, 2009. Calibrating and constraining molecular clocks. In SB Hedges; S Kumar, eds., *The Timetree of Life*. Oxford University Press, Oxford, 35–86.
- Bertrand, S; Fuentealba, J; Aze, A; Hudson, C; Yasuo, H; Torrejon, M; Escriva, H; Marcellini, S, 2013. A dynamic history of gene duplications and losses characterizes the evolution of the SPARC family in eumetazoans. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 280 :20122963.
- Blais, S; MacKenzie, LA; Wilson, MVH, 2011. Tooth-like scales in Early Devonian Eugnathostomes and the "outside-in" hypothesis for the origin of teeth in vertebrates. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 32 :1189–1199.
- Blakey, PR; Lockwood, P, 1968. The environment of calcified components in keratins. *Calcified Tissue Research*, 2 :361–369.
- Blazejowski, B, 2004. Shark teeth from the Lower Triassic of Spitsbergen and their histology. *Polish Polar Research*, 25 :153–167.
- Boisvert, CA; Martins, CL; Edmunds, AG; Cocks, J; Currie, P, 2014. Capture, transport, and husbandry of elephant sharks (*Callorhynchus milii*) adults, eggs, and hatchlings for research and display. *Zoo Biology*, 34 :94–98.
- Bordat, C, 1987. Ultrastructural study of the vertebrae of the selachian *Scyliorhinus canicula*. *Canadian journal of zoology*, 65 :1435–1444.
- Borday-Birraux, V; Heyden, C; Debiais-Thibaud, M; Verreijdt, L; Stock, DW; Huysseune, A; Sire, JY, 2006. Expression of Dlx genes during the development of the zebrafish pharyngeal dentition : evolutionary implications. *Evolution and Development*, 8 :130–141.
- Botella, H; Donoghue, PCJ; Martínez-Pérez, C, 2009. Enameloid microstructure in the oldest known chondrichthyan teeth. *Acta Zoologica*, 90 :103–108.

Bibliographie

- Bragulla, HH; Homberger, DG, 2009. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy*, 214 :516–559.
- Brazeau, MD, 2009. The braincase and jaws of a Devonian 'acanthodian' and modern gnathostome origins. *Nature*, 457 :305–308.
- Brazeau, MD; Friedman, M, 2014. The characters of Palaeozoic jawed vertebrates. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 170 :779–821.
- Brazeau, MD; Friedman, M, 2015. The origin and early phylogenetic history of jawed vertebrates. *Nature*, 520 :490–497.
- Briggs, DEG; Clarkson, ENK; Aldridge, RJ, 1983. The conodont animal. *Lethaia*, 16 :1–14.
- Cappetta, H, 1974. Sclerorhynchidae nov. fam., Pristidae et Pristiophoridae, un exemple de parallélisme chez les sélaciens. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences, série D*, 278 :225–228.
- Cappetta, H, 1980. Les Sélaciens du Crétacé supérieur du Liban. *Palaeontographica, Abt. A*, 168 :69–148.
- Cappetta, H, 1986. Types dentaires adaptatifs chez les selaciens actuels et post-paléozoïques. *Palaeovertebrata*, 16 :57–76.
- Cappetta, H, 1987. Extinctions et renouvellements fauniques chez les Sélaciens postjurassiques. *Mémoires de la Société géologique de France*, 150 :113–131.
- Cappetta, H, 2012. *Handbook of paleoichthyology volume 3E. Chondrichthyes. Mesozoic and Cenozoic elasmobranchii : Teeth*. Verlag F. Pfeil, Stuttgart, 512 .
- Cappetta, H; Duffin, CJ; Zidek, J, 1993. Chondrichthyes. In MJ Benton, ed., *The fossil record 2*. 593–609.
- Carlson, SJ, 1990. Vertebrate dental structures. In J Carter, ed., *Skeletal Biomineralization : Patterns, Processes and Evolutionary Trends*. Van Nostrand-Reinhold, New York, 73–79.
- Carlström, D, 1963. A Crystallographic Study of Vertebrate Otoliths. *Biological Bulletin*, 125 :441–463.

Bibliographie

- de Carvalho, MR, 1996. Higher-Level Elasmobranch phylogeny, basal Squaleans, and paraphyly. In MLJ Stiassny ; LR Parenti ; GD Johson, eds., *Interrelation of Fishes 3*. Academic Press, New York, 35–62.
- Chen, C ; Wang, Z ; Saito, M ; Tohei, T ; Takano, Y ; Ikuhara, Y, 2014. Fluorine in shark teeth : Its direct atomic-resolution imaging and strengthening function. *Angewandte Chemie - International Edition*, 53 :1543–1547.
- Chen, M ; Zou, M ; Yang, L ; He, S, 2012. Basal jawed vertebrate phylogenomics using transcriptomic data from solexa sequencing. *PLoS ONE*, 7 :e36256.
- Claeson, KM, 2011. The synarcual cartilage of batoids with emphasis on the synarcual of Rajidae. *Journal of morphology*, 272 :1444–1463.
- Claeson, KM, 2014. The impacts of comparative anatomy of electric rays (Batoidea : Torpediniformes) on their systematic hypotheses. *Journal of Morphology*, 275 :597–612.
- Claeson, KM ; Dean, MN, 2011. Cartilaginous fish skeletal anatomy. In FA P, ed., *Encyclopedia of fish physiology : From genome to environment*. Elsevier Inc., San Diego : Academic Press, 419–427.
- Claeson, KM ; Underwood, CJ ; Ward, DJ, 2013. *Tingitanius tenuimandibulus*, a new platyrhinid batoid from the Turonian (Cretaceous) of Morocco and the cretaceous radiation of the Platyrhinidae. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 33 :1019–1036.
- Clement, JG, 1986. *Development, structure and composition of chondrichthyan skeletal tissues*. *PhD Thesis*. University of Lodon.
- Clement, JG, 1992. Re-examination of the fine structure of endoskeletal mineralization in Chondrichthyans : Implications for growth, ageing and calcium Homeostasis. *Marine and Freshwater Research*, 43 :157.
- Coates, MI ; Gess, RW, 2007. A new reconstruction of *Onychoselache traquairi*, comments on early chondrichthyan pectoral girdles and hybodontiform phylogeny. *Palaentology*, 50 :1421–1446.
- Coates, MI ; Sequeira, SEK, 2001. A new stethacanthid chondrichthyan from the lower Carboniferous of Bearsden, Scotland. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 21 :438–459.

Bibliographie

- Coates, MI ; Sequeria, SEK ; Sanson, IJ ; Smith, MM, 1998. Spines and tissues of ancient sharks. *Nature* :729–730.
- Compagno, LJV, 1990. Alternative life-history styles of cartilaginous fishes in time and space. *Environmental Biology of Fishes*, 28 :33–75.
- Compagno, LJV, 1999. Endoskeleton. In W Hamlett, ed., *Sharks, Skates and Rays. The biology of elasmobranch fishes*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 69–92.
- Compagno, LJV ; Last, PR, 1999. Pristidae (Sawfishes), Rhinidae (Wedgefishes), Platyrrhinidae (Thornback rays). In KE Carpenter ; VH Niem, eds., *FAO Identification Guide for Fishery Purposes. The Living Marine Resources of the Western Central Pacific*. Food and Agriculture Organization, Rome, 1410–1432.
- Compagnucci, C ; Debiais-Thibaud, M ; Coolen, M ; Fish, J ; Griffin, JN ; Bertocchini, F ; Minoux, M ; Rijli, FM ; Borday-Birraux, V ; Casane, D ; Mazan, S ; Depew, MJ, 2013. Pattern and polarity in the development and evolution of the gnathostome jaw : both conservation and heterotopy in the branchial arches of the shark, *Scyliorhinus canicula*. *Developmental biology*, 377 :428–48.
- Conrath, CL ; Musick, JA, 2012. Reproductive Biology of Elasmobranchs. In JC Carrier ; JA Musick ; MR Heithaus, eds., *Reproductive Biology of Elasmobranchs*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2 edition, 291–312.
- Crawford, CH ; Naylor, GJP, 2015. Skeletal anatomy in the chondrichthyan tree of life. *Integrative and Comparative Biology* :211–356.
- Crompton, AW ; Parkyn, DG, 1963. On the lower jaw of Diarthognathys and the origin of the mammalian lower jaw. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 140 :697–749.
- Cuny, G ; Benton, MJ, 1999. Early radiation of the neoselachian sharks in Western Europe. *Geobios*, 32 :193–204.
- Cuny, G ; Rieppel, O ; Sander, PM, 2001. The shark fauna from the Middle Triassic (Anisian) of North-Western Nevada. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 133 :285–301.
- Cuny, G ; Risnes, S, 2005. The enameloid microstructure of the teeth of Synchodontiform sharks (Chondrichthyes : Neoselachii). *PalArch*, 3 :8–19.

Bibliographie

- Cuny, G ; Srisuk, P ; Khamha, S ; Suteethorn, V ; Tong, H, 2009. A new elasmobranch fauna from the Middle Jurassic of southern Thailand. *Geological Society, London, Special Publications*, 315 :97–113.
- Cuny, G ; Suteethorn, V ; Buffetaut, E, 2004. Freshwater hybodont sharks from the lower cretaceous of Thailand. In *Symposium proceedings International Congress on the Biology of Fish, Manaus, Brazil*. 15–26.
- Dahdul, WM ; Balhoff, JP ; Blackburn, DC ; Diehl, AD ; Haendel, MA ; Hall, BK ; Lapp, H ; Lundberg, JG ; Mungall, CJ ; Ringwald, M ; Segerdell, E ; Van Slyke, CE ; Vickaryous, MK ; Westerfield, M ; Mabee, PM, 2012. A unified anatomy ontology of the vertebrate skeletal system. *PloS one*, 7 :e51070.
- Darling, AI, 1943. The Distribution of the Enamel Cuticle and Its Significance. *Proceedings of the Royal Society of Medecine*, 36 :499–502.
- Davis, DD ; Gore, UR, 1936. Clearing and staining skeletons of small vertebrates. *Fiel-diana Techniques*, 4 :28.
- Davis, SP ; Finarelli, JA ; Coates, MI, 2012. Acanthodes and shark-like conditions in the last common ancestor of modern gnathostomes. *Nature*, 486 :247–250.
- Deakos, MH, 2012. The reproductive ecology of resident manta rays (*Manta alfredi*) off Maui, Hawaii, with an emphasis on body size. *Environmental Biology of Fishes*, 94 :443–456.
- Dean, B, 1906. Chimaeroid fishes and their development. *Publications of the Carnegie Institution of Washington*, 32 :1–194.
- Dean, B, 1909. Studies on fossil fishes (sharks, chimaeroids and arthrodires). *Memoirs of the American Museum of Natural History, Part V*, 9 :211–287.
- Dean, MN ; Bizzarro, JJ ; Summers, AP, 2007. The evolution of cranial design, diet, and feeding mechanisms in batoid fishes. *Integrative and comparative biology*, 47 :70–81.
- Dean, MN ; Chiou, WA ; Summers, AP, 2005a. Morphology and Ultrastructure of Prismatic Calcified Cartilage. *Microscopy and Microanalysis*, 11 :1196–1197.
- Dean, MN ; Mull, CG ; Gorb, SN ; Summers, AP, 2009. Ontogeny of the tessellated skeleton : insight from the skeletal growth of the round stingray *Urobatis halleri*. *Journal of anatomy*, 215 :227–239.

Bibliographie

- Dean, MN ; Summers, AP, 2006. Mineralized Cartilage in the skeleton of chondrichthyan fishes. *Zoology*, 109 :164–168.
- Dean, MN ; Wilga, CD ; Summers, AP, 2005b. Eating without hands or tongue : specialization, elaboration and the evolution of prey processing mechanisms in cartilaginous fishes. *Biology letters*, 1 :357–361.
- Debiais-Thibaud, M ; Borday-Birraux, V ; Germon, I ; Bourrat, F ; Metcalfe, CJ ; Casane, D ; Laurenti, P, 2007. Development of oral and pharyngeal teeth in the medaka (*Oryzias latipes*) : comparison of morphology and expression of *efel* gene. *Journal of Experimental Zoology Part B : Molecular and Developmental Evolution*, 308 :693–708.
- Debiais-Thibaud, M ; Oulion, S ; Bourrat, F ; Laurenti, P ; Casane, D ; Borday-Birraux, V, 2011. The homology of odontodes in gnathostomes : insights from *Dlx* gene expression in the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. *BMC evolutionary biology*, 11 :307.
- Delsate, D ; Candoni, L, 2001. description de nouveaux morphotypes dentaires de Batomorphii toarciens (Jurassique inférieur) du Bassin de Paris Archaeobatidae nov. fam. *Bulletin de la Société des Naturalistes Luxembourgeois*, 102 :131–143.
- Derycke, C ; Cloutier, R ; Candilier, AM, 1995. Palaeozoic vertebrates of northern France and Belgium : Part II. Chondrichthyes ; Acanthodii ; Actinopterygii (uppermost Silurian to Carboniferous). *Geobios*, 28 :343–350.
- Didier, D, 1995. Phylogenetic systematics of extant chimaeroid fishes (Holocephali, Chimaeroidei). *American Museum Novitates*, 3119 :1–86.
- Didier, DA ; Kemper, JM ; Ebert, DA, 2012. Phylogeny, biology, and classification of extant holocephalans. In JC Carrier ; JA Musick ; MR Heithaus, eds., *Biology of Sharks and their Relatives*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2 edition, 97–124.
- Didier, DA ; LeClair, EE ; Vanbuskirk, DR, 1998. Embryonic staging and external features of development of the chimaeroid fish, *Callorhynchus milii* (Holocephali, Callorhynchidae). *Journal of Morphology*, 236 :25–47.
- Didier, DA ; Stahl, BJ ; Zangerl, R, 1994. Development and growth of compound tooth plates in *Callorhynchus milii*. *Journal of Morphology*, 222 :73–89.
- Dingerkus, G ; Séret, B ; Guilbert, E, 1991. Multiple prismatic calcium phosphate layers in the jaws of present-day sharks (Chondrichthyes ; Selachii). *Experientia*, 47 :38–40.

Bibliographie

- Dingerkus, G ; Uhler, LD, 1977. Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain technology*, 52 :229–232.
- Domingues, MG ; Jaeger, MMM ; Araujo, VC ; Araujo, NS, 2000. Expression of cytokeratins in human enamel organ. *European Journal of Oral Sciences*, 108 :43–47.
- Donoghue, PCJ, 2002. Evolution of development of the vertebrate dermal and oral skeletons : unraveling concepts, regulatory theories, and homologies. *Paleobiology*, 28 :474–507.
- Donoghue, PCJ ; Aldridge, RJ, 2000. Donogh 2000 min skeleton.pdf. In PE Ahlberg, ed., *Major events in early vertebrate evolution : palaeontology, phylogeny, genetics and development*. Taylor & Francis, London, 85–155.
- Donoghue, PCJ ; Forey, PL ; Aldridge, RJ, 2000. Conodont affinity and chordate phylogeny. *Biological Reviews*, 75 :191–251.
- Donoghue, PCJ ; Keating, JN, 2014. Early vertebrate evolution. *Palaeontology*, 57 :879–893.
- Donoghue, PCJ ; Rücklin, M, 2014. The ins and outs of the evolutionary origin of teeth. *Evolution & development*, 12 :1–12.
- Donoghue, PCJ ; Sansom, IJ, 2002. Origin and early evolution of vertebrate skeletonization. *Microscopy research and technique*, 59 :352–372.
- Donoghue, PCJ ; Sansom, IJ ; Downs, JP, 2006. Early evolution of vertebrate skeletal tissues and cellular interactions, and the canalization of skeletal development. *Journal of Experimental Zoology Part B : Molecular and Developmental Evolution*, 306 :278–294.
- Douady, CJ ; Dosay, M ; Shivji, MS ; Stanhope, MJ, 2003. Molecular phylogenetic evidence refuting the hypothesis of Batoidea (rays and skates) as derived sharks. *Molecular phylogenetics and evolution*, 26 :215–221. ISSN 1055-7903.
- Dunn, KA ; McEachran, JD ; Honeycutt, RL, 2003. Molecular phylogenetics of myliobatiform fishes (Chondrichthyes : Myliobatiformes), with comments on the effects of missing data on parsimony and likelihood. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27 :259–270.

Bibliographie

- Dupret, V ; Sanchez, S ; Goujet, D ; Tafforeau, P ; Ahlberg, PE, 2014. A primitive placoderm sheds light on the origin of the jawed vertebrate face. *Nature*, 507 :500–503.
- Duverger, O ; Ohara, T ; Shaffer, JR ; Donahue, D ; Zerfas, P ; Dullnig, A ; Crecelius, C ; Beniash, E ; Marazita, ML ; Morasso, MI, 2014. Hair keratin mutations in tooth enamel increase dental decay risk. *Journal of Clinical Investigation*, 124 :5219–5224.
- Eames, BF ; Allen, N ; Young, J ; Kaplan, A ; Helms, JA ; Schneider, RA, 2007. Skeletogenesis in the swell shark *Cephaloscyllium ventriosum*. *Journal of anatomy*, 210 :542–54.
- Eames, BF ; Yan, YL ; Postlethwait, JH, 2012. Evolution of the osteoblast : skeletogenesis in gar and zebrafish. *BMC Evolutionary Biology*, 12 :27.
- El Toubi, MR, 1949. The development of the chondrocranium of the spiny dogfish, *Acanthias vulgaris* (*Squalus acanthias*). Part I. Neurocranium, mandibular and hyoid arches. *Journal of morphology*, 84 :227–279.
- Ellis, JR ; Shackley, SE, 1997. The reproductive biology of *Scyliorhinus canicula* in the Bristol Channel, U.K. *Journal of Fish Biology*, 51 :361–372.
- Enault, S ; Cappetta, H ; Adnet, S, 2013. Simplification of the enameloid microstructure of large stingrays (Chondrichthyes : Myliobatiformes) : a functional approach. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 169 :144–155.
- Enault, S ; Guinot, G ; Koot, M ; Cuny, G, 2015a. Chondrichthyan tooth enameloid : past, present, and future. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 174 :549–570.
- Enault, S ; Muñoz, DN ; Silva, WTaF ; Borday-Birraux, V ; Bonade, M ; Oulion, S ; Ventéo, S ; Marcellini, S ; Debais-Thibaud, M, 2015b. Molecular footprinting of skeletal tissues in the catshark *Scyliorhinus canicula* and the clawed frog *Xenopus tropicalis* identifies conserved and derived features of vertebrate calcification. *Frontiers in Genetics*, 6 :1–14.
- Estêvão, MD ; Silva, N ; Redruello, B ; Costa, R ; Gregório, S ; Canário, AVM ; Power, DM, 2011. Cellular morphology and markers of cartilage and bone in the marine teleost *Sparus auratus*. *Cell and Tissue Research*, 343 :619–635.
- Everett, MM ; Miller, WA, 1981. Histochemistry of lower vertebrate calcified structures. I. Enamel of the dogfish *Squalus acanthius* compared with mammalian enamel and homologous dentine. *Journal of morphology*, 170(1) :95–111.

Bibliographie

- Exposito, JY ; Valcourt, U ; Cluzel, C ; Lethias, C, 2010. The fibrillar collagen family. *International Journal of Molecular Sciences*, 11 :407–426.
- Fields, S ; Johnson, M, 2005. Cell biology. Whither model organism research? *Science*, 307 :1885–1886.
- Finarelli, JA ; Coates, MI, 2014. Chondrenchelys problematica (Traquair, 1888) re-described : a Lower Carboniferous, eel-like holocephalan from Scotland. *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 105 :35–59.
- Francillon-Vieillot, H ; de Buffrénil, V ; Castanet, J ; Géraudie, J ; Meunier, FJ, 1990. Microstructure and mineralization of vertebrate skeletal tissues. In J Carter, ed., *Skeletal Biomineralization : Patterns, Processes and Evolutionary Trends*. Van Nostrand-Reinhold, New York, 471–530.
- Fraser, IE, 1969. Proteins of keratin and their synthesis. I. Proteins of prekeratin and keratin. *Australian Journal of Biological Science*, 22 :213–229.
- Friedman, M ; Brazeau, MD, 2013. Palaeontology : A jaw-dropping fossil fish. *Nature*, 502 :175–177.
- Fudge, DS ; Gardner, KH ; Forsyth, VT ; Riekel, C ; Gosline, JM, 2003. The mechanical properties of hydrated intermediate filaments : insights from hagfish slime threads. *Biophysical Journal*, 85 :2015–2027.
- Garman, S, 1913. The plagiostomia (sharks, skates and rays. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College*, 36 :1–528.
- Gasse, B ; Chiari, Y ; Silvent, J ; Davit-Béal, T ; Sire, JY, 2015. Amelotin : an enamel matrix protein that experienced distinct evolutionary histories in amphibians, sauropsids and mammals. *BMC Evolutionary Biology*, 15 :47.
- Gegenbaur, C, 1872. *Untersuchungen zur vergleichenden anatomie der wirbelthiere. Drittes heft das kopfskelet der selachier, ein beitrag zur erkenntniss der genese des kopfskeletes der wirberlthiere*. Wilhelm Engelmann, Leipzig, 316 .
- Gess, RW ; Coates, MI ; Rubidge, BS, 2006. A lamprey from the Devonian period of South Africa. *Nature*, 443 :981–984.
- Giles, S ; Friedman, M ; Brazeau, MD, 2015. Osteichthyan-like cranial conditions in an Early Devonian stem gnathostome. *Nature*, 2015 :1–3.

Bibliographie

- Gillis, JA ; Dahn, RD ; Shubin, NH, 2009a. Chondrogenesis and homology of the visceral skeleton in the little skate, *Leucoraja erinacea* (Chondrichthyes : Batoidea). *Journal of Morphology*, 270 :628–643.
- Gillis, JA ; Dahn, RD ; Shubin, NH, 2009b. Shared developmental mechanisms pattern the vertebrate gill arch and paired fin skeletons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 :5720–5724.
- Gillis, JA ; Donoghue, PCJ, 2007. The homology and phylogeny of chondrichthyan tooth enameloid. *Journal of Morphology*, 268 :33–49.
- Gillis, JA ; Rawlinson, KA ; Bell, J ; Lyon, WS ; Baker, CVH ; Shubin, NH, 2011. Holocephalan embryos provide evidence for gill arch appendage reduction and opercular evolution in cartilaginous fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 :1507–1512.
- Gillis, JA ; Shubin, NH, 2009. The evolution of gnathostome development : Insight from chondrichthyan embryology. *Genesis*, 47(12) :825–841.
- Ginter, M ; Hampe, O ; Duffin, CJ, 2010. *Handbook of paleoichthyology volume 3D. Chondrichthyes. Paleozoic elasmobranchii : Teeth*. Verlag F. Pfeil, Stuttgart, 168 .
- Gisbert, E ; Darias, MJ ; Font-i Furnols, M, 2012. Advantages and limitations of X-ray and computed tomography systems for the study of the skeleton in meagre (*Argyrosomus regius*). *Journal of Applied Ichthyology*, 28 :441–445.
- Glikman, LS, 1964. *Sharks of Paleogene and their stratigraphic significance*. Nauka Press, Moscou, 229 .
- Goodrich, ES, 1930. *Studies on the structure and development of vertebrates*. Macmillan, London, 882 .
- Goto, M, 1978. Histogenetic studies on the teeth of leopard shark (*Triakis scyllia*). *Journal of the Stomatological Society, Japan*, 45 :527–584.
- Goudemand, N ; Orchard, MJ ; Urdy, S ; Bucher, H ; Tafforeau, P, 2011. Synchrotron-aided reconstruction of the conodont feeding apparatus and implications for the mouth of the first vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 :8720–8724.
- Grady, JE, 1970. Tooth development in sharks. *Archives of oral biology*, 15 :613–619.

Bibliographie

- Grogan, ED ; Lund, R, 2000. Debeerius ellefseni (Fam. Nov., Gen. Nov., Spec. Nov.), an autodiastylic chondrichthyan from the Mississippian bear gulch limestone of Montana (USA), the relationships of the chondrichthyes, and comments on gnathostome evolution. *Journal of Morphology*, 243 :219–245.
- Grogan, ED ; Lund, R, 2004. The origin and relationships of early chondrichthyes. In JC Carrier ; JA Musick ; MR Heithaus, eds., *Biology of Sharks and their Relatives*. CRC Press, 1 edition, 3–31.
- Gross, J ; Lapierre, C, 1962. Collagenolytic activity in amphibian tissues : a tissue culture assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48 :1014–1022.
- Guinot, G ; Adnet, S ; Cappetta, H, 2012. An analytical approach for estimating fossil record and diversification events in sharks, skates and rays. *PloS one*, 7 :e44632.
- Guinot, G ; Adnet, S ; Cavin, L ; Cappetta, H, 2013. Cretaceous stem chondrichthyans survived the end-Permian mass extinction. *Nature communications*, 4 :2669.
- Guinot, G ; Cappetta, H, 2011. Enameloid microstructure of some Cretaceous Hexanchiformes and Synchondontiformes (Chondrichthyes, Neoselachii) : new structures and systematic implications. *Microscopy research and technique*, 74 :196–205.
- Guinot, G ; Cappetta, H ; Adnet, S, 2014. A rare elasmobranch assemblage from the Valanginian (Lower Cretaceous) of southern France. *Cretaceous Research*, 48 :54–84.
- Guinot, G ; Cavin, L, 2015. Fish (Actinopterygii and Elasmobranchii) diversification patterns through deep time. *Biological Reviews*, In press.
- Hall, BK, 2003. Evo-Devo : Evolutionary developmental mechanisms. *The International journal of developmental biology*, 47 :491–495.
- Hall, BK, 2005. *Bones and Cartilage : developmental and evolutionary skeletal biology*. Elsevier Academic Press, San Diego, California & London, 792 .
- Hampe, O, 1991. Histological investigations on fossil teeth of the shark-order Xenacanthida (Chondrichthyes : Elasmobranchii) as revealed by fluorescence microscopy. *Mitteilungen für Wissenschaft und Technik*, 10 :17–27.
- Heckert, AB ; Miller-Camp, JA, 2013. Tooth enamel microstructure of Revueltosaurus and Krzyzanowskisaurus (Reptilia :Archosauria) from the Upper Triassic Chinle

Bibliographie

- Group, USA : implications for function, growth, and phylogeny. *Palaeontologia Electronica*, 16 :23 pp.
- Hedges, SB, 2001. Molecular evidence for the early history of living vertebrates. In PE Ahlberg, ed., *Major events in early vertebrate evolution : palaeontology, phylogeny, genetics and development*. Taylor & Francis, London, 119–134.
- Heinicke, MP ; Naylor, GJP ; Hedges, SB, 2009. Cartilaginous fishes (Chondrichthyes). In SB Hedges ; S Kumar, eds., *Timetree of Life*.
- Herman, J ; van Vaes, H, 2014. Observations concerning the evolution and the parasystematics of all the living and fossil Chlamydoselachiformes, Squatiniformes, Orectolobiformes, and Pristiophoriformes, based on both biological and odontological data. Suggestion of a possible origin of. *Géominpal Belgica*, 6 :347.
- Herold, RC ; Graver, HT ; Christner, P, 1980. Immunohistochemical localization of amelogenins in enameloid of lower vertebrate teeth. *Science*, 207 :1357–1358.
- Hertwig, O, 1874. Über bau und entwicklung der placoidschuppen und der zähne der selachier. *Jennaische Zeitschrift für Medicin und Naturwissenschaften*, 8 :331–404.
- Hirasawa, T ; Kuratani, S, 2015. Evolution of the vertebrate skeleton : morphology , embryology , and development. *Zoological Letters*, 1 :1–17.
- Hirasawa, T ; Nagashima, H ; Kuratani, S, 2013. The endoskeletal origin of the turtle carapace. *Nature Communications*, 4 :2107.
- Holmgren, N, 1940. Studies on the head in fishes. Embryological, morphological and phylogenetical researches. Part I. Development of the skull in sharks and rays. *Acta Zoologica*, 21 :51–267.
- Hunter, J, 1771. The natural history of the human teeth.
- Huyseune, A ; Sire, J ; Witten, PE, 2009. Evolutionary and developmental origins of the vertebrate dentition. *Journal of Anatomy*, 214 :465–476.
- Huyseune, A ; Sire, JY, 1990. Ultrastructural observations on chondroid bone in *Hemichromis bimaculatus* (Teleostei, Cichlidae). *Tissue & cell*, 22 :371–383.
- Huyseune, A ; Sire, JY, 1998. Evolution of patterns and processes in teeth and tooth-related tissues in non-mammalian vertebrates. *European journal of oral sciences*, 106 :437–481.

Bibliographie

- Huysseune, A ; Takle, H ; Soenens, M ; Taerwe, K ; Witten, PE, 2008. Unique and shared gene expression patterns in Atlantic salmon (*Salmo salar*) tooth development. *Development Genes and Evolution*, 218 :427–37.
- Hwang, SH, 2005. Phylogenetic patterns of enamel microstructure in dinosaur teeth. *Journal of Morphology*, 266 :208–240.
- Hwang, SH, 2011. The evolution of dinosaur tooth enamel microstructure. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 86 :183–216.
- Inoue, JG ; Miya, M ; Lam, K ; Tay, BH ; Danks, JA ; Bell, J ; Walker, TI ; Venkatesh, B, 2010. Evolutionary origin and phylogeny of the modern holocephalans (Chondrichthyes : Chimaeriformes) : a mitogenomic perspective. *Molecular Biology and Evolution*, 27 :2576–2586.
- Ishiyama, M ; Sasagawa, I ; Akai, J, 1984. The inorganic content of pleromin in tooth plates of the living holocephalan, *Chimaera phantasma*, consists of a crystalline calcium phosphate known as beta-Ca₃(PO₄)₂ (whitlockite). *Archives of Histology and Cytology*, 47 :89–94.
- Ishiyama, M ; Yoshie, S ; Teraki, Y ; Cooper, EWT, 1991. Ultrastructure of pleromin, a highly mineralized tissue comprizing crystalline calcium phosphate known as whitlockite, in holocephalian tooth plates. In S Suga ; H Nakahara, eds., *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems*. Springer, 453–457.
- Ivanov, A, 2005. Early Permian chondrichthyans of the Middle and South Urals. *Revista Brasileira de Paleontologia*, 8 :127–138.
- Ivanov, AO, 2000. Tooth internal morphology of Devonian phoebodont sharks. *Proceedings of the 3rd European Elasmobranch Association Meeting, Boulogne-sur-Mer, 1999* :5–14.
- Janvier, P, 1978. On the oldest known teleostome fish *Andreolepis hedei* Gross (Ludlow of Gotland), and the systematic position of the lophosteids. *ENSV TA Toim. Geol*, 27 :88–95.
- Janvier, P, 1996. *Early vertebrates*. Clarendon Press, Oxford Monographs on Geology and Geophysics, 408 .

Bibliographie

- Janvier, P, 2011. Comparative anatomy : all vertebrates do have vertebrae. *Current Biology*, 21 :661–663.
- Janvier, P, 2015. Facts and fancies about early fossil chordates and vertebrates. *Nature*, 520 :483–489.
- Janvier, P ; Arsenault, M, 2002. Calcification of early vertebrate cartilage. *Nature*, 417 :609.
- Janvier, P ; Arsenault, M, 2007. The anatomy of *Euphanerops longaevus* Woodward, 1900, an anaspid-like jawless vertebrate from the Upper Devonian of Miguasha, Quebec, Canada. *Geodiversitas*, 29 :143–216.
- Jenner, RA ; Wills, MA, 2007. The choice of model organisms in evo-devo. *Nature reviews. Genetics*, 8 :311–319.
- Jerve, A ; Johanson, Z ; Ahlberg, P ; Boisvert, C, 2014. Embryonic development of fin spines in *Callorhinchus milii* (Holocephali) ; implications for chondrichthyan fin spine evolution. *Evolution & Development*, 16 :339–353.
- Johanson, Z ; Boisvert, C ; Maksimenko, A ; Currie, P ; Trinajstic, K, 2015. Development of the eynarcual in the elephant sharks (Holocephali ; Chondrichthyes) : implications for vertebral formation and fusion. *Plos One*, 10 :e0135138.
- Johanson, Z ; Smith, MM, 2003. Placoderm fishes, pharyngeal denticles, and the vertebrate dentition. *Journal of Morphology*, 257 :289–307.
- Johanson, Z ; Trinajstic, K ; Carr, R ; Ritchie, A, 2013. Evolution and development of the synarcual in early vertebrates. *Zoomorphology*, 132 :95–110.
- Karatayute-Talimaa, VN, 1989. Karata. *2nd Colloquium on Paleozoic Fishes, Estonia*.
- Karatayute-Talimaa, VN, 1998. Determination methods for the exoskeletal remains of early vertebrates. *Fossil Record*, 1 :21–51.
- Kawasaki, H ; Kawaguchi, T ; Yano, T ; Fujimura, S ; Yago, M, 1980. Chemical nature of proteins in the placoid scale of the blue shark, *Prionace glauca* L. *Archives of Oral Biology*, 25 :313–320.
- Kawasaki, K, 2009a. The SSCP gene repertoire in bony vertebrates and graded differences in mineralized tissues. *Development Genes and Evolution*, 219 :147–57.

Bibliographie

- Kawasaki, K, 2009b. The SCPP gene repertoire in bony vertebrates and graded differences in mineralized tissues. *Development Genes and Evolution*, 219 :147–157.
- Kawasaki, K, 2013. Odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM) and amelotin : Major players in hypermineralization of enamel and enameloid. *Journal of Oral Biosciences*, 55 :85–90.
- Kawasaki, K ; Buchanan, AV ; Weiss, KM, 2007. Gene duplication and the evolution of vertebrate skeletal mineralization. *Cells Tissues Organs*, 186 :7–24.
- Kawasaki, K ; Suzuki, T ; Weiss, KM, 2004. Genetic basis for the evolution of vertebrate mineralized tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 :11356–11361.
- Kawasaki, K ; Suzuki, T ; Weiss, KM, 2005. Phenogenetic drift in evolution : the changing genetic basis of vertebrate teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 :18063–18068.
- Kawasaki, K ; Weiss, KM, 2003. Mineralized tissue and vertebrate evolution : the secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7) :4060–4065.
- Kawasaki, K ; Weiss, KM, 2008. SCPP Gene Evolution and the Dental Mineralization Continuum. *Journal of Dental Research*, 87 :520–531.
- Keating, JN ; Marquart, CL ; Donoghue, PCJ, 2015. Histology of the heterostracan dermal skeleton : Insight into the origin of the vertebrate mineralised skeleton. *Journal of Morphology*, 276 :657–680.
- Kemp, N, 1985. Ameloblastic secretion and calcification of the enamel layer in shark teeth. *Journal of Morphology*, 184 :215–230.
- Kemp, NE, 1999. Integumentary system and teeth. In WC Hamlett, ed., *Shark, skates, and rays : The biology of elamobranch fishes*. John Hopkins Press, Baltimore, 43–68.
- Kemp, NE ; Westrin, SK, 1979. Ultrastructure of calcified cartilage in the endoskeletal tesserae of sharks. *Journal of Morphology*, 160 :75–109.
- Kerebel, B ; Daculsi, G ; Renaudin, S, 1977. Ultrastructure des ameloblastes au cours de la formation de l'emailloide des sélaciens. *Biologie Cellulaire*, 28 :125–130.

Bibliographie

- Kerebel, B ; Maillard, Y ; Clergeau-Guerithault, S ; Daculsi, G ; Jacob, P, 1974. Tooth histology in *Prionace glauca* L. *Journal de Biologie Buccale*, 2 :99–113.
- Kerr, T, 1955. Development and structure of the teeth in the dogfish *Squalus acanthias* and *Scyliorhynchus caniculus*. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 125 :95–112.
- Klug, S, 2010. Monophyly, phylogeny and systematic position of the Synchondontiformes (Chondrichthyes, Neoselachii). *Zoologica Scripta*, 39 :37–49.
- Koch, EA ; Spitzer, RH ; Pithawalla, RB ; Castillos, FA ; Parry, DAD, 1995. Hagfish biopolymer : a type I/type II homologue of epidermal keratin intermediate filaments. *International Journal of Biological Macromolecules*, 17 :283–292.
- von Koenigswald, W, 2004. Enamel microstructure of rodent molars, classification, and parallelisms, with a note on the systematic affiliation of the enigmatic Eocene rodent *Protoptychus*. *Journal of Mammalian Evolution*, 11 :127–142.
- von Koenigswald, W ; Martin, T ; Pfretzschner, HU, 1993. Phylogenetic interpretation of enamel structures in mammalian teeth : possibilities and problems. In FS Szalay ; MJ Novacek ; MC McKenna, eds., *Mammal Phylogeny, Placentals*. Springer-Verlag, New York, 303–314.
- von Koenigswald, W ; Rose, KD, 2005. The enamel microstructure of the early Eocene pantodont *Coryphodon* and the nature of the zigzag enamel. *Journal of Mammalian Evolution*, 12 :419–432.
- Kolmann, MA ; Huber, DR ; Dean, MN ; Grubbs, RD, 2014. Myological variability in a decoupled skeletal system : batoid cranial anatomy. *Journal of Morphology*, 275 :862–81.
- Kriwet, J, 2004. The systematic position of the Cretaceous sclerorhynchid sawfishes (Elasmobranchii, *Pristiorajea*). In G Arratia ; A Tintori, eds., *Mesozoic Fishes 3 - Systematics, Paleoenvironments and Biodiversity*. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, 57–73.
- Kriwet, J ; Benton, MJ, 2004. Neoselachian (Chondrichthyes, Elasmobranchii) diversity across the Cretaceous Tertiary boundary. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeobiology*, 214 :181–194.

Bibliographie

- Kriwet, J ; Kiessling, W ; Klug, S, 2009. Diversification trajectories and evolutionary life-history traits in early sharks and batoids. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences*, 276 :945–951.
- Kvam, T, 1946. Comparative study of the ontogenetic and phylogenetic development of dental enamel. *Norske Tannlaegeforen*, 56 :1–198.
- Kvam, T, 1950. The development of mesodermal enamel on piscine teeth. *Aktietrykkeriet Trondhjem, Trondheim* :1–115.
- Landis, WJ ; Silver, FH, 2009. Mineral deposition in the extracellular matrices of vertebrate tissues : identification of possible apatite nucleation sites on type I collagen. *Cells Tissues Organs*, 189 :20–24.
- Linde, A ; Goldberg, M, 1993. Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 4 :679–728.
- Lingham-Soliar, T, 2014. *The Vertebrate Integument-Volume 1*, volume 1. Springer, 268 .
- Lison, L, 1941. Recherches sur la structure et l'histogenèse des dents des poissons dipneustes. *Archives de biologie, Paris*, 52 :279–320.
- Long, JA ; Burrow, CJ ; Ginter, M ; Maisey, JG ; Trinajstić, KM ; Coates, MI ; Young, GC ; Senden, TJ, 2015. First shark from the Late Devonian (Frasnian) Gogo Formation, Western Australia sheds new light on the development of tessellated calcified cartilage. *Plos One*, 10 :e0126066.
- Lovejoy, N, 1996. Systematics of myliobatoid elasmobranchs : with emphasis on the phylogeny and historical biogeography of neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae : Rajiformes). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 117 :207–257.
- Lübke, A ; Enax, J ; Loza, K ; Prymak, O ; Gaengler, P ; Fabritius, HO ; Raabe, D ; Epple, M, 2015. Dental lessons from past to present : ultrastructure and composition of teeth from plesiosaurs, dinosaurs, extinct and recent sharks. *RSC Adv.*, 5 :61612–61622.
- Luer, CA ; Blum, PC ; Gilbert, PW, 1990. Rate of Tooth Replacement in the Nurse Shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Copeia*, 1990 :182–191.
- Lund, R, 1983. On a dentition of *Polyrhizodus* (Chondrichthyes, Petalodontiformes) from

Bibliographie

- the Namurian bear gulch limestone of Montana. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 3 :1–6.
- Lunkinmaa, PL ; Vaahtokari, A ; Vainio, S ; Sandberg, M ; Waltimo, J ; Thesleff, I, 1993. Transient expression of type III collagen by odontoblasts : developmental changes in the distribution of pro-alpha 1(III) and pro-alpha 1(I) collagen mRNAs in dental tissues. *Matrix*, 13 :503–515.
- Maddison, WP ; Maddison, DR, 2009. Mesquite : a modular system for evolutionary analysis. Version 2.71 <http://mesquiteproject.org>.
- Mader, H, 1986. Schuppen und zähne von acanthodiern und elasmobranchiern aus dem Uter-Devon Spaniens (Pisces). *Göttinger Arbeiten zur Geologie und Palaontologie*, 28 :1–59.
- Maisey, J ; Miller, R ; Turner, S, 2009. The braincase of the chondrichthyan *Doliodus* from the Lower Devonian Campbellton Formation of New Brunswick, Canada. *Acta Zoologica*, 90 :109–122.
- Maisey, JG, 1980. An evaluation of jaw suspension in sharks. *American Museum Novitates*, 2706 :1–17.
- Maisey, JG, 1987. Notes on the structure and phylogeny of vertebrate otholits. *Copeia*, 1987 :495–499.
- Maisey, JG ; Anderson, ME, 2001. A primitive chondrichthyan braincase from the Early Devonian of South Africa. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 21 :702–713.
- Maisey, JG ; Naylor, GJP ; Ward, D, 2004. Nesoelachian phylogeny and rise of modern elasmobranch diversity. In G Arratia ; A Tintori, eds., *Mesozoic Fishes 3- Systematics, Paleoenvironments and Biodiversity*. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, Munchen, 17–56.
- Mallatt, J ; Winchell, CJ, 2007. Ribosomal RNA genes and deuterostome phylogeny revisited : More cyclostomes, elasmobranchs, reptiles, and a brittle star. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43 :1005–1022.
- Manzanares, E ; Plá, C ; Martínez-Pérez, C ; Rasskin, D ; Botella, H, 2014. The enameloid microstructure of euselachian (Chondrichthyes) scales. *Paleontological Journal*, 48 :1060–1066.

Bibliographie

- Marshall, AD, 2009. Redescription of the genus *Manta* with resurrection of *Manta alfredi* (Krefft, 1868 (Chondrichthyes; Myliobatoidei; Mobulidae). *Zootaxa*, 2301 :1–28.
- Martinek, N; Shahab, J; Sodek, J; Ringuette, M, 2007. Is SPARC an evolutionarily conserved collagen chaperone? *Journal of Dental Research*, 86 :296–305.
- Maxwell, EE; Fröbisch, NB; Heppleston, AC, 2008. Variability and conservation in late chondrichthyan development : ontogeny of the winter skate (*Leucoraja ocellata*). *Anatomical record*, 291 :1079–1087.
- McEachran, JD; Aschliman, NC, 2004. Phylogeny of Batoidea. In JC Carrier; JA Musick; MR Heithaus, eds., *Biology of Sharks and their Relatives*. CRC Press, 1 edition, 79–113.
- McEachran, JD; Dunn, KA, 1998. Phylogenetic analysis of skates, a morphologically conservative clade of elasmobranchs (Chondrichthyes : Rajidae). *Copeia*, 2 :271–290.
- McEachran, JD; Dunn, KA; Miyake, T, 1996. *Interrelationships of the batoid fishes (Chondrichthyes : Batoidea)*. Academic Press, 63–84 .
- Mellinger, J; Wisez, F, 1993. Etude des écailles primaires de l'embryon de la roussette *Scyliorhinus canicula* (Chondrichthyes, Scyliorhinidae) au microscope électronique à balayage. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie, 13ème série*, 14 :13–22.
- Miyake, T; Vaglia, JL; Taylor, LH; Hall, BK, 1999. Development of dermal denticles in skates (Chondrichthyes, Batoidea) : patterning and cellular differentiation. *Journal of Morphology*, 241 :61–81.
- Moradian-Oldak, J, 2012. Protein- mediated enamel mineralization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 1(17) :1996–2023.
- Moss, ML, 1970. Enamel and bone in shark teeth : With a note on fibrous enamel in fishes. *Cells Tissues Organs*, 77 :161–187.
- Moss, ML, 1977. Skeletal tissues in sharks. *American Zoologist*, 17 :335–342.
- Moss, ML; Jones, SJ; Piez, KA, 1964. Calcified ectodermal collagens of shark tooth enamel and teleost scale. *Science*, 145 :940–942.
- Moy-Thomas, JA, 1939. The early evolution and relationships of the elasmobranchs. 14 :1–26.

Bibliographie

- Moyer, JK ; Riccio, ML ; Bemis, WE, 2015. Development and microstructure of tooth histotypes in the blue shark, *Prionace glauca* (Carcharhiniformes : Carcharhinidae) and the great white shark, *Carcharodon carcharias* (Lamniformes : Lamnidae). *Journal of Morphology*, 276 :797–817.
- Mundlos, S ; Schwah, B ; Reichert, T ; Zabel, B, 1992. Distribution of osteonectin mRNA and protein during human embryonic and fetal development. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 40 :283–291.
- Murdock, DJE ; Dong, XP ; Repetski, JE ; Marone, F ; Stampanoni, M ; Donoghue, PCJ, 2013. The origin of conodonts and of vertebrate mineralized skeletons. *Nature*, 502 :546–549.
- Nanci, AP ; Bringas, NJ ; Slavkin, HC, 1983. Selachian tooth development. III. Ultrastructural features of secretory amelogenesis in *Squalus acanthias*. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology*, 3 :53–73.
- Naylor, GJP ; Ryburn, JA ; Fedrigo, O ; Lopez, JA, 2005. Phylogenetic relationships among the major lineages of modern elasmobranchs. In WC Hamlett, ed., *Reproductive biology and phylogeny of chondrichthyes : sharks, rays and chimaeras, Vol.3*. Science Publishers, Endfield, USA, 1–25.
- Nielsen, E, 1932. Permo-Carboniferous Fishes from East Greenland. *Meddelelser om Grønland*, 6 :5–55.
- Nielsen, E, 1952. On a new or little known Edestidae from the Permian and Triassic of East Greenland. *Palaeozoologica Groenlandica*, 6 :5–55.
- Nishida, K, 1990. Phylogeny of the suborder Myliobatidoidei. *Memoirs of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, 37 :1–108.
- Notarbartolo Di Sciara, G, 1987. A revisionary study of the genus *Mobula* Rafinesque, 1810 (Chondrichthyes : Mobulidae) with the description of a new species. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 91 :1–91.
- Ohazama, A ; Haworth, KE ; Ota, MS ; Khonsari, RH ; Sharpe, PT, 2010. Ectoderm, endoderm, and the evolution of heterodont dentitions. *Genesis*, 48 :382–389.
- Ohno, S, 1970. *Evolution by gene duplication*. Springer, 160 .

Bibliographie

- Orvig, T, 1966. Histologic studies of placoderms and fossil elasmobranchs. 2. On the dermal skeleton of two late Palaeozoic elasmobranchs. *Arkiv för Zoologi*, 2 :1–39.
- Orvig, T, 1967. Phylogeny of tooth tissues : evolution of some calcified tissues in early vertebrates. In AEW Miles, ed., *Structural and chemical organization of teeth*. Academic Press, New York, 45–110.
- Orvig, T, 1978. Microstructure and growth of the dermal skeleton in fossil actinopterygian fishes : Nephrotus and Colobodus, with remarks on the dentition in other forms. *Zoologica scripta*, 7 :297–326.
- Orvig, T, 1985. Histologic studies of ostracoderms, placoderms and fossil elasmobranchs 5. ptyctodontid tooth plates and their bearing on holocephalan ancestry : the condition of chimaerids. *Zoologica Scripta*, 14 :55–79.
- OShaughnessy, KL ; Dahn, RD ; Cohn, MJ, 2015. Molecular development of chondrichthyan claspers and the evolution of copulatory organs. *Nature Communications*, 6 :6698.
- Ota, KG ; Fujimoto, S ; Oisi, Y ; Kuratani, S, 2011. Identification of vertebra-like elements and their possible differentiation from sclerotomes in the hagfish. *Nature Communications*, 2 :373.
- Oulion, S ; Borday-Birraux, V ; Debiais-Thibaud, M ; Mazan, S ; Laurenti, P ; Casane, D, 2011. Evolution of repeated structures along the body axis of jawed vertebrates, insights from the *Scyliorhinus canicula* Hox code. *Evolution & Development*, 13 :247–59.
- Owen, R, 1840. *Odontography; or, A treatise on the comparative anatomy of the teeth; their physiological relations, mode of development, and microscopic structure, in the vertebrate animals*. Baillière, H., London,.
- Parker, WK, 1878. On the structure and development of the skull in sharks and skates. *The Transactions of the Zoological Society of London*, 10 :189–234.
- Pavan-Kumar, A ; Gireesh-Babu, P ; Babu, PP ; Jaiswar, AK ; Hari Krishna, V ; Prasad, KP ; Chaudhari, A ; Raju, SG ; Chakraborty, SK ; Krishna, G ; Lakra, WS, 2014. Molecular phylogeny of elasmobranchs inferred from mitochondrial and nuclear markers. *Molecular Biology Reports*, 41 :447–457.

Bibliographie

- Peignoux-Deville, J; Janvier, 1984. L'os du requin ou la biologie au rendez-vous de la paléontologie. *La Recherche*, 15 :1140–1142.
- Peignoux-Deville, J; Lallier, F; Vidal, B, 1982. Evidence for the presence of osseous tissue in dogfish vertebrae. *Cell and Tissue Research*, 222 :605–614.
- Pereira, AA; Medeiros, MA, 2008. A new sclerorhynchiform (Elasmobranchii) from the Middle Cretaceous of Brazil. *Revista Brasileira de Paleontologia*, 11 :207–212.
- Peyer, B, 1968. *Comparative odontology*. University of Chicago Press, 458 .
- Phleger, CF, 1998. Buoyancy in marine fishes : direct and indirect role of lipids. *American Zoologist*, 38 :321–195.
- Poole, DFG, 1967. Phylogeny of tooth tissue : enameloid and enamel in recent vertebrates, with a note on the history of cementum. In AEW Miles, ed., *Structural and chemical organization of teeth*. Academic Press, New York, 111–149.
- Poole, DFG, 1971. An introduction to the phylogeny of calcified tissue. In A Dahlberg, ed., *Dental Morphology and Evolution*. University of Chicago Press, Chicago, 65–79.
- Poole, DFG; Gillett, MS, 1969. Collagen fibers in immature enameloid of dogfish teeth. *Journal of Dental Research*, 48 :1119.
- Porter, ME; Koob, TJ; Summers, AP, 2007. The contribution of mineral to the material properties of vertebral cartilage from the smooth-hound shark *Mustelus californicus*. *Journal of Experimental Biology*, 210 :3319–3327.
- Pradel, A; Maisey, JG; Tafforeau, P; Mapes, RH; Mallatt, J, 2014. A Palaeozoic shark with osteichthyan-like branchial arches. *Nature*, 509 :608–11.
- Pradel, A; Tafforeau, P; Maisey, JG; Janvier, P, 2011. A new Paleozoic Symmoriiformes (chondrichthyes) from the late carboniferous of Kansas (USA) and cladistic analysis of early chondrichthyans. *PLoS ONE*, 6 :e24938.
- Pratt, HL; Carrier, JC, 2001. A review of elasmobranch reproductive behavior with a case study on the nurse, *Ginglymostoma cirratum*. *Environmental Biology of Fishes*, 60 :157–188.
- Preschoft, H; Reif, WE; H, MWH, 1974. Funktionsanpassungen in Form und Struktur an Haifischzähnen. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 143 :315–344.

Bibliographie

- Prostak, K; Seifert, P; Skobe, Z, 1990. The effects of colchicine on the ultrastructure of odontogenic cells in the common skate, *Raja erinacea*. *The American Journal of Anatomy*, 189 :77–91.
- Prostak, K; Skobe, Z, 1985. The effects of colchicine on the ultrastructure of the dental epithelium and odontoblasts of teleost tooth buds. *J. Craniofac. Gen. Dev. Biol.*, 575–88. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology*, 5 :75–88.
- Prostak, K; Skobe, Z, 1986. Ultrastructure of the dental epithelium and odontoblasts during enameloid matrix deposition in cichlid teeth. *Journal of Morphology*, 187 :169–172.
- Prostak, KS; Seifert, P; Skobe, Z, 1993. Enameloid formation in two tetraodontiform fish species with high and low fluoride contents in enameloid. *Archives of Oral Biology*, 38 :1031–1044.
- Prostak, KS; Skobe, Z, 1988a. Ultrastructure of odontogenic cells during enameloid matrix synthesis in tooth buds from an elasmobranch, *Raja erinacea*. *The American journal of anatomy*, 182 :59–72.
- Prostak, KS; Skobe, Z, 1988b. Ultrastructure of odontogenic cells during enameloid matrix synthesis in tooth buds from an elasmobranch, *Raja erinacea*. *The American journal of anatomy*, 182 :59–72.
- Purnell, MA, 1995. Large eyes and vision in conodont. *Lethaia*, 28 :187–188.
- Qu, Q; Haitina, T; Zhu, M; Ahlberg, PE, 2015. New genomic and fossil data illuminate the origin of enamel. *Nature*, 526 :108–111.
- Quekett, J, 1846a. Additional observations on the intimate structure of bone. *Transactions of the Microscopical Society (London)*, II :59–64.
- Quekett, J, 1846b. On the intimate structure of bone, as composing the skeleton in four great classes of animals, viz. mammals, birds, reptiles, and fishes, with some remarks on the great value of the knowledge of such structure in determining the affinities of min. *Transactions of the Microscopical Society (London)*, II :46–58.
- Radinsky, L, 1961. Tooth histology as a taxonomic criterion for cartilaginous fishes. *Journal of Morphology*, 109 :73–92.

Bibliographie

- Regan, CT, 1906. A classification of the selachian fishes. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 1906 :722–758.
- Reif, WE, 1973. Morphologie und Ultrastruktur des Hai-„Schmelzes". *Zoologica Scripta*, 2 :231–250.
- Reif, WE, 1977. Tooth enameloid as a taxonomic criterion : 1. A new euselachian shark from the Rhaetic-Liassic boundary. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, Monatshefte*, 1977 :565–576.
- Reif, WE, 1978. Tooth enameloid as a taxonomic criterion : 2. Is *Dalatias barnstonensis* a squalomorphic shark. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, Monatshefte*, 1978 :42–58.
- Reif, WE, 1979. Structural convergence between enameloid of actinopterygian teeth and of shark teeth. *Scanning Electron Microscopy*, 2 :546–554.
- Reif, WE, 1980a. Development of dentition and dermal skeleton in embryonic *Scyliorhinus canicula*. *Journal of Morphology*, 166 :275–88.
- Reif, WE, 1980b. Tooth enameloid as a taxonomic criterion 3 : A new primitive shark family from the Lower Keuper. *Neues Jahrbuch fuer Geologie und Palaeontologie Abhandlungen*, 160 :61–72.
- Reif, WE, 1982. Evolution of dermal skeleton and dentition in vertebrates. In *Evolutionary Biology*. 287–368.
- Reif, WE, 2006. Conodonts, odontodes, stem-groups, and the ancestry of enamel genes. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, Abhandlungen*, 241 :405–439.
- Rensberger, J ; Königswald, W, 1980. Functional and phylogenetic interpretation of enamel microstructure in rhinoceroses. *Paleobiology*, 6 :477–495.
- Risnes, S, 1990. Structural characteristics of staircase-type Retzius lines in human dental enamel analyzed by scanning electron microscopy. *Anatomical Record*, 226 :135–146.
- Romer, AS, 1924. Pectoral limb musculature and shouldergirdler structure in fish and tetrapods. *The Anatomical Record*, 27 :119–143.
- Rücklin, M ; Donoghue, PCJ ; Johanson, Z ; Trinajstic, K ; Marone, F ; Stampanoni, M, 2012. Development of teeth and jaws in the earliest jawed vertebrates. *Nature*, 491 :748–751.

Bibliographie

- Ryll, B ; Sanchez, S ; Haitina, T ; Tafforeau, P ; Ahlberg, PE, 2014. The genome of *Callorhinchus* and the fossil record : A new perspective on SCPP gene evolution in gnathostomes. *Evolution and Development*, 16(3) :123–124.
- Sansom, IJ ; Smith, MM ; Smith, MP, 1996. Scales of thelodont and shark-like fishes from the Ordovician of Colorado. *Nature*, 379 :628–630.
- Sansom, IJ ; Smith, MM ; Smith, PM, 2001. The Ordovician radiation of vertebrates. In PE Ahlberg, ed., *Major events in early vertebrate evolution : palaeontology, phylogeny, genetics and development*. Taylor & Francis, London, 156–171.
- Sanson, IJ ; Smith, MP ; Armstrong, HA ; Smith, MM, 1992. Presence of the earliest vertebrate hard tissues in conodont. *Science*, 256 :1308–1211.
- Sasagawa, I, 1988. The appearance of matrix vesicles and mineralization during tooth development in three teleost fishes with well-developed enameloid and orthodontine. *Archives of Oral Biology*, 33 :75–86.
- Sasagawa, I, 1989. The fine structure of initial mineralisation during tooth development in the gummy shark, *Mustelus manazo*, Elasmobranchia. *Journal of Anatomy*, 164 :175–187.
- Sasagawa, I, 1993. Iron accumulation in the dental epithelial cells of *Tilapia nilotica*, a teleost. *Archives of Comparative Biology of Tooth Enamel*, 3 :19–28.
- Sasagawa, I, 1998. Mechanisms of mineralization in the enameloid of elasmobranchs and teleosts.
- Sasagawa, I, 2002a. Fine structural and cytochemical observations of dental epithelial cells during the enameloid formation stages in red stingrays *Dasyatis akajei*. *Journal of Morphology*, 252 :170–82.
- Sasagawa, I, 2002b. Mineralization patterns in elasmobranch fish. *Microscopy Research and Technique*, 59 :396–407.
- Sasagawa, I, 2002c. Mineralization patterns in elasmobranch fish. *Microscopy Research and Technique*, 59 :396–407.
- Sasagawa, I ; Akai, J, 1992. The fine structure of the enameloid matrix and initial mineralization during tooth development in the sting rays , *Dasyatis akajei* and *Urolophus aurantiacus*. *Microscopy*, 41 :242–252.

Bibliographie

- Sasagawa, I ; Ishiyama, M ; Yokosuka, H ; Mikami, M, 2013. Teeth and ganoid scales in *Polypterus* and *Lepisosteus*, the basic actinopterygian fish : An approach to understand the origin of the tooth enamel. *Journal of Oral Biosciences*, 55 :76–84.
- Satchell, PG ; Anderton, X ; Ryu, OH ; Luan, X ; Ortega, AJ ; Opamen, R ; Berman, BJ ; Witherspoon, DE ; Gutmann, JL ; Yamane, A ; M., ZD ; Simmer, JP ; Shuler, CF ; Diekwisch, TGH, 2002. Conservation and variation in enamel protein distribution during vertebrate tooth development. *The Journal of Experimental Zoology*, 294 :91–106.
- Scammon, RE, 1911. Normal plates of the development of *Squalus acanthias*. *Keibel's Normaltafeln zur Entwicklungsgeschichte der Wirbeltiere*, 12 :1–140.
- Schaeffer, B, 1963. Cretaceous fishes from Bolivia, with comments on pristid evolution. *American Museum Novitates*, 2159 :1–20.
- Schmidt, WJ, 1958. Faserung und durodentin. Metaplasie bei fischzähnen. *Anatomischer Anzeiger*, 105 :349–360.
- Schreger, BNG, 1800. Beitrag zur geschichte der zähne. *Beitrage für die Zergliederungskunst*, 1 :1–7.
- Sharpe, PT, 2001. Neural crest and tooth morphogenesis. *Advances in Dental Research*, 15 :4–7.
- Shellis, RP, 1978. The role of the inner dental epithelium in the formation of the teeth in fish. In PM Butler ; KA Joysey, eds., *Development, function and evolution of teeth*. Academic Press, London, 31–42.
- Shellis, RP ; Berkovitz, BKB, 1976. Observations on the dental anatomy of piranhas (Characidae) with special reference to tooth structure. *Journal of Zoology*, 180 :69–84.
- Shellis, RP ; Miles, AEW, 1974. Autoradiographic formation of enameloid and dentine matrices in teleost fishes using tritiated amino acids. *Proceedings of the Royal Society*, 53 :51–72.
- Shimizu, D ; Macho, G ; Spears, I, 2005. Effect of prism orientation and loading direction on contact stresses in prismatic enamel of primates : Implications for interpreting wear patterns. *American Journal of Physical Anthropology*, 126 :427–434.

Bibliographie

- Shirai, S, 1992. *Squalean phylogeny : a new framework of "squaloid" sharks and related taxa*. Hokkaido University Press, Hokkaido, 151 .
- Shirai, S, 1996. Phylogenetic interrelationships of neoselachians (Chondrichthyes, Euselachii). In MLJ Stiassny ; LR Parenti ; GD Johnson, eds., *Interrelationships of fishes*. Academic Press, San Diego, California & London.
- Sire, JY ; Davit-Béal, T ; Delgado, S ; Xun, G, 2007. The origin and evolution of enamel mineralization genes. *Cells, Tissues & Organs*, 186 :25–48.
- Sire, JY ; Delgado, S ; Fromentin, D ; Girondot, M, 2005. Amelogenin : Lessons from evolution. *Archives of Oral Biology*, 50 :205–212.
- Sire, JY ; Donoghue, PCJ ; Vickaryous, MK, 2009. Origin and evolution of the integumentary skeleton in non-tetrapod vertebrates. *Journal of Anatomy*, 214 :409–440.
- Slaughter, BH ; Springer, S, 1968. Replacement of rostral teeth in sawfishes and sawsharks. *Copeia*, 3 :499–506.
- Smith, MM, 1992. Microstructure and evolution of enamel amongst osteichthyan fishes and early tetrapods. In P Smith ; E Tchernov, eds., *Structure, Function and Evolution of Teeth*. Freund, 73–101.
- Smith, MM ; Coates, MI, 1998. Evolutionary origins of the vertebrate dentition : phylogenetic patterns and developmental evolution. *European journal of oral sciences*, 106(1) :482–500.
- Smith, MM ; Fraser, GJ ; Chaplin, N ; Hobbs, C ; Graham, A, 2009. Reiterative pattern of sonic hedgehog expression in the catshark dentition reveals a phylogenetic template for jawed vertebrates. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 276 :1225–33. ISSN 0962-8452. doi :10.1098/rspb.2008.1526.
- Smith, MM ; Hall, BK, 1990. Development and evolutionary origins of vertebrate skeletogenic and odontogenic tissues. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 65 :277–373.
- Smith, MM ; Johanson, Z, 2003. Separate evolutionary origins of teeth from evidence in fossil jawed vertebrates. *Science*, 299 :1235–6.
- Smith, MM ; Johanson, Z ; Underwood, C ; Diekwisch, TGH, 2012. Pattern formation

Bibliographie

- in development of chondrichthyan dentitions : a review of an evolutionary model. *Historical Biology*, 25 :127–142. doi :10.1080/08912963.2012.662228.
- Stark, J, 1844. On the existence of an osseous structure in the vertebral column of cartilaginous fishes. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 15 :643–656.
- Stefen, C ; Rensberger, JM, 2002. The specialized structure of hyaenid enamel : description and development within the lineage, including percrocotids. *Zoologische Abhandlungen (dresden)*, 52 :127–147.
- Stewart, G, 1906. On the membranous labyrinth of Echinorhinus, Estracion and Rhina. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 29 :439–442.
- Summers, AP, 2000. Stiffening the stingray skeleton - an investigation of durophagy in myliobatid stingrays (Chondrichthyes, Batoidea, Myliobatidae). *Journal of Morphology*, 243 :113–26.
- Tabuce, R ; Delmer, C ; Gheerbrant, E, 2007. Evolution of the tooth enamel microstructure in the earliest proboscideans (Mammalia). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 149 :611–628.
- Tamura, K ; Stecher, G ; Peterson, D ; Filipski, A ; Kumar, S, 2013. MBE MEGA6 : Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0.
- Termine, JD ; Kleinman, HK ; Whitson, SW ; Conn, KM ; McGarvey, ML, 1981. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell*, 26 :99–105.
- Thies, D, 1982. A neoselachian shark tooth from the Lower Triassic of the Kocaeli (= Bithynian) Peninsula, W Turkey. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, Monatshefte*, 5 :272–278.
- Thomasset, JJ, 1930. Recheres sur les tissus dentaires des Poissons fossiles. *Archives d'Anatomie, Histologie et Embryologie*, 10-11 :5–153.
- Tomes, CS, 1898. Upon the structure and development of the enamel in elasmobranch fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 190 :443–464.
- Tucker, A ; Sharpe, P, 2004. The cutting-edge of mammalian development ; how the embryo makes teeth. *Nature reviews. Genetics*, 5 :499–508.
- Turner, S ; Blicck, A ; Nowlan, GS, 2004. Vertebrates (Agnathans and Gnathostomes). In

Bibliographie

- B Webby ; F Paris ; M Droser ; I Percival, eds., *The Great Ordovician Biodiversification Event*. Columbia University Press, New York, 327–335.
- Turner, S ; Burrow, CJ ; Schultze, HP ; Blicek, A ; Reif, WE ; Rexroad, CB ; Bultynck, P ; Nowlan, GS, 2010. False teeth : conodont-vertebrate phylogenetic relationships revisited. *Geodiversitas*, 32 :545–594.
- Underwood, CJ, 2006. Diversification of the Neoselachii (Chondrichthyes) during the Jurassic. *Paleobiology*, 32 :215–235.
- Underwood, CJ ; Johanson, Z ; Welten, M ; Metscher, B ; Rasch, LJ ; Fraser, GJ ; Smith, MM, 2015. Development and evolution of dentition pattern and tooth order in the skates and rays (Batoidea ; Chondrichthyes). *Plos One*, 10 :e0122553.
- Venkatesh, B ; Lee, AP ; Ravi, V ; Maurya, AK ; Lian, MM ; Swann, JB ; Ohta, Y ; Flajnik, MF ; Sutoh, Y ; Kasahara, M ; Hoon, S ; Gangu, V ; Roy, SW ; Irimia, M ; Korzh, V ; Kondrychyn, I ; Lim, ZW ; Tay, BH ; Tohari, S ; Kong, KW ; Ho, S ; Lorente-Galdos, B ; Quilez, J ; Marques-Bonet, T ; Raney, BJ ; Ingham, PW ; Tay, A ; Hillier, LW ; Minx, P ; Boehm, T ; Wilson, RK ; Brenner, S ; Warren, WC, 2014. Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. *Nature*, 505 :174–179.
- Venkatesh, B ; Tay, A ; Dandona, N ; Patil, JG ; Brenner, S, 2005. A compact cartilaginous fish model genome. *Current Biology*, 15 :82–83.
- Vuorio, E ; De Crombrughe, B, 1990. The family of collagen genes. *Annual Review of Biochemistry*, 59 :837–872.
- Wada, H ; Okuyama, M ; Satoh, N ; Zhang, S, 2006. Molecular evolution of fibrillar collagen in chordates, with implications for the evolution of vertebrate skeletons and chordate phylogeny. *Evolution and Development*, 8 :370–377.
- Welten, M ; Smith, MM ; Underwood, C ; Johanson, Z, 2015. Evolutionary origins and development of saw-teeth on the sawfish and sawshark rostrum (Elasmobranchii ; Chondrichthyes). *Royal Society Open Science* :150189.
- Winchell, CJ ; Martin, AP ; Mallatt, J, 2004. Phylogeny of elasmobranchs based on LSU and SSU ribosomal RNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31 :214–24.
- Witten, PE ; Sire, JY ; Huysseune, A, 2014. Old, new and new-old concepts about the evolution of teeth. *Journal of Applied Ichthyology*, 30 :636–642.

Bibliographie

- Wueringer, BE ; Squire, L ; Collin, SP, 2009. The biology of extinct and extant sawfish (Batoidea : Sclerorhynchidae and Pristidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 19 :445–464.
- Wueringer, BE ; Squire, L ; Kajiura, SM ; Hart, NS ; Collin, SP, 2012. The function of the sawfish's saw. *Current Biology*, 22 :R150–R151.
- Wurmbach, H, 1932. Das wachstum des selachierwirbels und seiner und seiner gewebe. *Zool. Jahrb. (Anat.)*, 55 :1–136.
- Yano, K ; Sato, F ; Takahashi, T, 1999. Observations of the mating behavior of the manta ray, *Manta birostris*, at the Ogasawara Islands, Japan. *Ichthyological Research*, 46 :289–296.
- Young, GC, 2010. Placoderms (Armored Fish) : Dominant Vertebrates of the Devonian Period. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 38 :523–550.
- Zangerl, R, 1966. A New Shark of the Family Edestidae, *Ornithoprion hertwigi* from the Pennsylvanian Mecca and Logan Quarry Shales of Indiana. *Fieldiana Geology*, 16 :1–44.
- Zangerl, R, 1981. *Handbook of Paleoichthyology Volume 3A-Chondrichthyes I Paleozoic Elasmobranchii*. Verlag Dr. Friedrich Pfeil.
- Zangerl, R ; Winter, HF ; Hansen, MC, 1993. Comparative Microscopic Dental Anatomy in the Petalodontida (Chondrichthyes, Elasmobranchii). *Fieldiana Geology*, 26 :142.
- Zeicher-David, M ; Diekwisch, TG ; Fincham, A ; Lau, E ; MacDougall, M ; Moradian Ol-dak, J ; Simmer, J ; Snead, M ; Slavkin, HC, 1995. Control of ameloblast differentiation. *International Journal of Developmental Biology*, 39 :69–92.
- Zhang, GJ ; Eames, BF ; Cohn, MJ, 2009. Evolution of Vertebrate Cartilage Develop-ment. *Current Topics in Developmental Biology*, 86 :15–42.
- Zhu, M ; Yu, X ; Ahlberg, PE ; Choo, B ; Lu, J ; Qiao, T ; Qu, Q ; Zhao, W ; Jia, L ; Blom, H ; Zhu, Y, 2013. A Silurian placoderm with osteichthyan-like marginal jaw bones. *Nature*, 502 :1–7.

Annexe A : Matériel fossile et actuel

TABLEAU 0.1 – Matériel dentaire actuel et fossile

Taxon	Ordre	Famille	Age	Sexe	Numéro	Structure	Qté	Origine
<i>Bathyraja griseocauda</i>	Rajiformes	Arynchobatidae	Actuel	♀/♂	REC944-5M	Dent orale	2	Falklands
<i>Bathyraja smirnovii</i>	Rajiformes	Arynchobatidae	Actuel	♀/♂	REC0724-5M	Dent orale	2	Japon
<i>Atlantoraja</i> sp.	Rajiformes	Arynchobatidae	Actuel	-	REC998M	Dent orale	1	Brésil
<i>Rhinoraja multispinis</i>	Rajiformes	Arynchobatidae	Actuel	♀	REC0001M	Dent orale	3	Falklands
<i>Sympterygia bonapartei</i>	Rajiformes	Arynchobatidae	Actuel	♀	REC0405M	Dent orale	3	Argentine
<i>Zapteryx exasperata</i>	Rajiformes	Rhinobatidae	Actuel	♀/♂	REC0387-8M	Dent orale	3	Mexique
<i>Rhinobatos cemiculus</i>	Rajiformes	Rhinobatidae	Actuel	♀	REC1039M	Dent orale	2	Sénégal
<i>Rajella fyllae</i>	Rajiformes	Rajidae	Actuel	♀	REC0409M	Dent orale	1	-
<i>Raja undulata</i>	Rajiformes	Rajidae	Actuel	♂	REC0465-6M	Dent orale	1	-
<i>Leucoraja circularis</i>	Rajiformes	Rajidae	Actuel	♀	REC0942M	Dent orale	3	France
<i>Okamejei kenojei</i>	Rajiformes	Rajidae	Actuel	♂	REC0450M	Dent orale	1	Corée
<i>Dipturus oxyrinchus</i>	Rajiformes	Rajidae	Actuel	♀/♂	REC0700-5M	Dent orale	2	France
<i>Raja asterias</i>	Rajiformes	Rajidae	Actuel	♀	REC0849M	Dent orale	3	-
<i>Leucoraja</i> sp.	Rajiformes	Rajidae	Actuel	♂	-	Dent orale	3	-
<i>Raja clavata</i>	Rajiformes	Rajidae	Actuel	♀	REC0706-13M	Dent orale	24	France
<i>Raja clavata</i>	Rajiformes	Rajidae	Actuel	♀	REC0706-13M	Écaille	2	France
<i>Platyrrhinoidis triseriata</i>	Rajiformes	Platyrrhinidae	Actuel	♀	REC0398-9M	Dent orale	4	Californie
<i>Anacanthobatis borneensis</i>	Rajiformes	Anacanthobatidae	Actuel	♂	-	Dent orale	1	-
<i>Rhina ancylostoma</i>	Rajiformes	Rhinidae	Actuel	♂	REC0612M	Dent orale	3	Bombay
<i>Pristis</i> sp.	Rajiformes	Pristidae	Actuel	-	-	Dent orale	3	-
<i>Rhynchobatus</i> sp.	Rajiformes	Rhynchobatidae	Actuel	-	-	Dent orale	6	-
<i>Neotrygon kuhlii</i>	Myliobatiformes	Dasyatidae	Actuel	♀/♂	REC0641-2M/45-7M	Dent orale	1	Nouvelle-Calédonie
<i>Taeniurops meyeri</i>	Myliobatiformes	Dasyatidae	Actuel	♀/♂	REC648-9M	Dent orale	3	Nouvelle Calédonie
<i>Himantura uarnak</i>	Myliobatiformes	Dasyatidae	Actuel	-	REC0784M	Dent orale	2	-
<i>Himantura polylepis</i>	Myliobatiformes	Dasyatidae	Actuel	-	-	Dent orale	2	-
<i>Dasyatis margarita</i>	Myliobatiformes	Dasyatidae	Actuel	-	REC0478M	Dent orale	25	Sénégal
<i>Pteroplatytrygon violacea</i>	Myliobatiformes	Dasyatidae	Actuel	♀	REC0746/0482M	Dent orale	5	Maroc/France
<i>Manta birostris</i>	Myliobatiformes	Mobulidae	Actuel	♀	NS583-160	Dent orale	4	-
<i>Mobula japonica</i>	Myliobatiformes	Mobulidae	Actuel	♂	NS83024	Dent orale	4	-
<i>Mobula thurstoni</i>	Myliobatiformes	Mobulidae	Actuel	♂	NS83-077	Dent orale	4	-
<i>Mobula tarapacana</i>	Myliobatiformes	Mobulidae	Actuel	♀	NS83-161	Dent orale	10	Côte d'Ivoire
<i>Mobula mobular</i>	Myliobatiformes	Mobulidae	Actuel	♀	NS883	Dent orale	2	Algérie
<i>Mobula munkiana</i>	Myliobatiformes	Mobulidae	Actuel	♂	NS82-028	Dent orale	2	-
<i>Gymnura altavela</i>	Myliobatiformes	Gymnuridae	Actuel	♀	REC0522M	Dent orale	2	Sénégal

TABLEAU 0.1 – Matériel dentaire actuel et fossile

Taxon	Ordre	Famille	Age	Sexe	Numéro	Structure	Qté	Origine
<i>Gymnura micrura</i>	Myliobatiformes	Gymnuridae	Actuel	-	REC0518-9M	Dent orale	2	-
<i>Gymnura marmorata</i>	Myliobatiformes	Gymnuridae	Actuel	♀	REC0523M	Dent orale	5	Californie
<i>Aetobatus narinari</i>	Myliobatiformes	Myliobatidae	Actuel	-	-	Dent orale	3	Mer rouge
<i>Aetomylaeus nichofii</i>	Myliobatiformes	Myliobatidae	Actuel	-	REC0467-8M	Dent orale	1	Océan Indien
<i>Myliobatis aquila</i>	Myliobatiformes	Myliobatidae	Actuel	-	REC0469M	Dent orale	2	France
<i>Myliobatis</i> sp.	Myliobatiformes	Myliobatidae	Actuel	-	REC0777M	Dent orale	3	Mexique
<i>Rhinoptera bonasus</i>	Myliobatiformes	Rhinopteridae	Actuel	-	REC0651M	Dent orale	3	Mexique
<i>Potamotrygon</i> sp.	Myliobatiformes	Potamotrygonidae	Actuel	♂	1997-0498	Dent orale	2	-
<i>Plesiobatis daviesi</i>	Myliobatiformes	Plesiobatidae	Actuel	♂	REC0510M	Dent orale	3	Hong Kong
<i>Torpedo marmorata</i>	Torpediniformes	Torpedinidae	Actuel	-	REC534M	Dent orale	4	-
<i>Heterodontus zebra</i>	Heterodontiformes	Heterodontidae	Actuel	-	REC0193M	Dent orale	2	Hong Kong
<i>Heterodontus francisci</i>	Heterodontiformes	Heterodontidae	Actuel	-	REC0765M	Dent orale	1	Mexique
<i>Heterodontus</i> sp.	Heterodontiformes	Heterodontidae	Actuel	-	-	Dent orale	8	-
<i>Sphyrna tiburo</i>	Carcharhiniformes	Sphyrnidae	Actuel	♀	REC0143M	Dent orale	3	Antilles
<i>Mustelus mustelus</i>	Carcharhiniformes	Triakidae	Actuel	♂	REC0320M	Dent orale	4	France
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	Actuel	♂	REC0366-9M	Dent orale	9	France
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	Actuel	-	-	Denticule	3	France
<i>Scyliorhinus stellaris</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	Actuel	♂	-	Dent orale	3	France
<i>Squalus acanthias</i>	Squaliformes	Squalidae	Actuel	-	-	Aiguillon	1	-
<i>Rhincodon typus</i>	Orectolobiformes	Rhincodontidae	Actuel	-	-	Dent orale	1	Afrique du Sud
<i>Cetorhinus maximus</i>	Lamniformes	Cetorhinidae	Actuel	-	-	Dent orale	2	Mer du Nord
<i>Hydrolagus</i> sp.	Chimaeriformes	Chimaeridae	Actuel	-	-	Dent orale	1	Atlantique
<i>Sphyaena</i> sp.	Perciformes	Sphyaenidae	Actuel	-	-	Dent orale	1	Tahiti, Polynésie Française
<i>Belemnobatis</i> sp.	Rajiformes	Rhinobatidae	Aptien	-	-	Dent orale	2	Carniol, France
<i>Rhinobatos</i> sp.	Rajiformes	Rhinobatidae	Eocène	♀/♂	-	Dent orale	2	Belgique
<i>Rhinobatos bruzelliensis</i>	Rajiformes	Rhinobatidae	Eocène	-	-	Dent orale	1	Belgique
Rhinobatoide sp.	Rajiformes	Rhinobatidae	Santonien	-	-	Dent orale	2	Tyk-Butak, Kazakhstan
<i>Squatirhina</i> sp.	Rajiformes	Rhinobatoidei i.f.	Santonien	-	-	Dent orale	1	Tyk-Butak, Kazakhstan
c.f. <i>Raja</i> sp.	Rajiformes	Rajidae	Pliocène	-	-	Dent orale	1	Caroline du Nord, USA
<i>Toarcibatis elongata</i>	Rajiformes i.s.	Archaeobatidae	Toarcien	-	-	Dent orale	2	Halanzy, Belgique
<i>Cristabatis crescentiformis</i>	Rajiformes i.s.	Archaeobatidae	Toarcien	-	-	Dent orale	1	Halanzy, Belgique
<i>Hypsobatis weileri</i>	Rajiformes	Hypsobatidae	Maastrichtien	-	-	Dent orale	2	Ben Guerir C6, Maroc
<i>Youssoubatis ganntourensis</i>	Rajiformes	Hypsobatidae	Camp.-Maas.	-	-	Dent orale	1	Ben guerir C2, Maroc
<i>Ctenopristis</i> sp.	Rajiformes	Sclerorhynchidae	Maastrichtien	-	-	Dent orale	2	Ben Guerir C6, Maroc

TABLEAU 0.1 – Matériel dentaire actuel et fossile

Taxon	Ordre	Famille	Age	Sexe	Numéro	Structure	Qté	Origine
<i>Ctenopristis</i> sp.	Rajiformes	Sclerorhynchidae	Maastrichtien	-	-	Denticule rostral	2	Ben Guerir C6, Maroc
<i>Pucapristis branisi</i>	Rajiformes	Sclerorhynchidae	Crétacé	-	-	Dent orale	2	Toro toro, Bolivie
<i>Pucapristis branisi</i>	Rajiformes	Sclerorhynchidae	Crétacé	-	-	Denticule rostral	2	Toro toro, Bolivie
<i>Ganopristis leptodon</i>	Rajiformes	Sclerorhynchidae	Maastrichtien	-	-	Dent orale	2	Ben guerir C2, Maroc
<i>Ganopristis leptodon</i>	Rajiformes	Sclerorhynchidae	Maastrichtien	-	-	Denticule rostral	1	Ben guerir C2, Maroc
cf. <i>Onchosaurus</i> sp.	Rajiformes	Sclerorhynchidae	Turonien	-	-	Dent orale	1	Aït benn ali, Maroc
<i>Ptychotrygonoides</i> cf. <i>pouiti</i>	Rajiformes	Ptychotrygonidae	Cénomaniens	-	-	Dent orale	2	Lussant, France
<i>Ptychotrygon</i> sp.	Rajiformes	Ptychotrygonidae	Turonien	-	-	Dent orale	1	Aït benn ali, Maroc
<i>Parapalaeobates</i> cf. <i>atlanticus</i>	Rajiformes	Parapalaeobatidae	Campanien	-	-	Dent orale	3	Imin Tanout, Maroc
<i>Rhynchobatus pristinus</i>	Rajiformes	Rhynchobatidae	Burdigalien	-	-	Dent orale	2	St George d'Orque, France
<i>Pristis</i> sp.	Rajiformes	Pristidae	Mio.-Eocène	-	-	Dent orale	1	Contamana, Pérou
<i>Aetobatus</i> sp.	Myliobatiformes	Myliobatidae	Eocène Sup.	-	-	Dent orale	1	Km55, Egypte
<i>Plinthicus</i> sp.	Myliobatiformes	Myliobatidae	Miocène	-	-	Dent orale	3	Lee Creek, USA
<i>Igdabatis</i> sp.	Myliobatiformes	Myliobatidae	SEEM2	-	-	Dent orale	1	-
<i>Rhinoptera</i> sp.	Myliobatiformes	Myliobatidae	Bartonien	-	-	Dent orale	1	Kebar, Tunisie
<i>Burnhamia</i> sp.	Myliobatiformes	Myliobatidae	Yprésien Sup.	-	-	Dent orale	3	Prémontré, France
<i>Myliobatis raouzi</i>	Myliobatiformes	Myliobatidae	Thanétien	-	-	Dent orale	2	Sidi Daoui, Maroc
<i>Brachyrhizodus wichitaensis</i>	Myliobatiformes	Myliobatidae	Maastrichtien	-	UM-HBR137-47	Dent orale	2	Big Brooks, USA
<i>Eomobula</i> sp.	Myliobatiformes	Myliobatidae	Yprésien	-	-	Dent orale	1	Prémontré, France
<i>Leidybatis jugosus</i>	Myliobatiformes	Myliobatidae	Lutérien	-	-	Dent orale	2	Togo
<i>Leidybatis</i> sp.	Myliobatiformes	Myliobatidae	Lutérien	-	-	Dent orale	1	Maroc
<i>Jacquhermania duponti</i>	Myliobatiformes	Gymnuridae	Yprésien	-	-	Dent orale	2	Prémontré, France
<i>Gymnura</i> sp.	Myliobatiformes	Gymnuridae	Burdigalien	-	-	Dent orale	2	St George d'Orque, France
<i>Archaeomanta</i> sp.	Myliobatiforme	Mobulidae	Priabodien	-	-	Dent orale	2	Kebar, Tunisie
<i>Archaeomanta melenhorsti</i>	Myliobatiformes	Mobulidae	Yprésien	-	-	Dent orale	1	Maroc
<i>Oromobula dakhlaensis</i>	Myliobatiformes	Mobulidae	Eocène sup.	-	-	Dent orale	2	Samlat formation, Maroc
<i>Mobula loupianensis</i>	Myliobatiformes	Mobulidae	Miocène moy.	♀/♂	-	Dent orale	2	Loupian, France
<i>Rhombodus binckhorsti</i>	Myliobatiformes	Rhombodontidae	Maastrichtien	-	-	Dent orale	1	Ben Guerir C2, Maroc
<i>Rhombodus meridionalis</i>	Myliobatiformes	Rhombodontidae	Maastrichtien	-	-	Dent orale	1	Oued Erguita, Maroc
<i>Rhombodus</i> sp.	Myliobatiformes	Rhombodontidae	Maastrichtien	-	-	Dent orale	1	Ben Guerir, Maroc
<i>Dasyatis</i> sp.	Myliobatiformes	Dasyatidae	Yprésien	-	-	Dent orale	3	Prémontré, France
<i>Dasyatis</i> sp.	Myliobatiformes	Dasyatidae	Priabodien	-	-	Dent orale	1	Dakhla, Maroc
<i>Dasyatis branisai</i>	Myliobatiformes	Dasyatidae	Cretacé	-	-	Dent orale	1	Toro toro, Bolivie
<i>Dasyatis molinoensis</i>	Myliobatiformes	Dasyatidae	Cretacé	-	-	Dent orale	1	Toro toro, Bolivie

TABLEAU 0.1 – Matériel dentaire actuel et fossile

Taxon	Ordre	Famille	Age	Sexe	Numéro	Structure	Qté	Origine
<i>Dasyatis schaefferi</i>	Myliobatiformes	Dasyatidae	Cretacé	-	-	Dent orale	1	Toro toro, Bolivie
Dasyatidae indet.	Myliobatiformes	Dasyatidae	Miocène	♂	-	Dent orale	1	Lubéron, France
<i>Coupagezia larivei</i>	Myliobatiformes	Dasyatoidea i.f.	Thanétien	♀/♂	-	Dent orale	2	Ouled abdoun, Maroc
c.f. <i>Heterobatis talbaouii</i>	Myliobatiformes	Dasyatoidea i.f.	Yprésien	-	-	Dent orale	1	Virginie, USA
<i>Potamotrygon</i> sp.	Myliobatiformes	Potamotrygonidae	Mio.-Eocène	♀/♂	-	Dent orale	2	Contamana, Pérou
<i>Pristiophorus</i> sp.	Pristiophoriformes	Pristiophoridae	Eocène	-	-	Denticule rostral	2	St. Pankraz, Autriche
<i>Pristiophorus lacipidinensis</i>	Pristiophoriformes	Pristiophoridae	Lut.-Bartonien	-	-	Dent orale	3	Landes, France
<i>Pristiophorus lacipidinensis</i>	Pristiophoriformes	Pristiophoridae	Lut.-Bartonien	-	-	Denticule rostral	1	Landes, France
<i>Cretomanta canadensis</i>	Lamniformes?	?	Turonien	-	-	Dent orale	2	Dakota, USA
<i>Striatolamia macrota</i>	Lamniformes	Mitsukurinidae	Eocène inf.	-	-	Dent orale	2	Angleterre
<i>Rhincodon</i> sp.	Orectolobiformes	Rhincodontidae	Miocène	-	-	Dent orale	1	Belgique
Actinopterygii indet.	-	-	Miocène	-	-	Dent orale	1	Lubéron, France
Sphyaenidae indet.	Perciformes	Sphyaenidae	Priabodien/Rupélien	-	-	Dent orale	1	Dakhla, Maroc
c.f. <i>Colossoma</i> sp.	Characiformes	Serrasalmidae	Mio.-Eocène	-	-	Dent orale	2	Contamana, Pérou
"Piranha"	Characiformes	Serrasalmidae	Mio.-Eocène	-	-	Dent orale	1	Contamana, Pérou

TABLEAU 0.2 – Matériel biologique

Taxon	Ordre	Famille	taille	Sexe	Structure	Utilisation	Origine
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	9 cm	-	Mâchoire inf.	HIS	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	9 cm	-	Vertèbres.	HIS	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	7 cm	-	Mâchoire inf.	HIS	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	7 cm	-	Vertèbres.	HIS	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	8 cm	-	Mâchoire inf.	Histologie	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	10 cm	-	Mâchoire sup.	Histologie	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	7 cm	-	Vertèbre caudale	Histologie	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	8 cm	-	Vertèbre caudale	Histologie	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	20 cm	♀	Mâchoire inf.	Histologie	Coll. H. Cappetta
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	8 cm	-	Mâchoire inf.	MET	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	8 cm	-	Vertèbres caudales	MET	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	6 cm	-	Spécimen entier	Microtomographie	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	6 cm	-	Spécimen entier	Microtomographie	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	6.1 cm	-	Spécimen entier	Microtomographie	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	6.7 cm	-	Spécimen entier	Microtomographie	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	7.1 cm	-	Spécimen entier	Microtomographie	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	7.5 cm	-	Spécimen entier	Microtomographie	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	8 cm	-	Spécimen entier	Microtomographie	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	10 cm	-	Spécimen entier	Microtomographie	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	10 cm	-	Spécimen entier	Microtomographie	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	10 cm	-	Spécimen entier	Microtomographie	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	24 cm	-	Tête	Microtomographie	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	35 cm	♂	Spécimen entier	Préparation ostéologique	SMEL
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Carcharhiniformes	Scyliorhinidae	38 cm	♀	Spécimen entier	Préparation ostéologique	SMEL
<i>Raja clavata</i>	Rajiformes	Rajidae	14 cm	-	Mâchoire inf.	Histologie	Mareis
<i>Raja clavata</i>	Rajiformes	Rajidae	14 cm	-	Vertèbre caudale	Histologie	Mareis
<i>Raja clavata</i>	Rajiformes	Rajidae	14 cm	-	Synarcual	Histologie	Mareis
<i>Raja clavata</i>	Rajiformes	Rajidae	14 cm	-	Mâchoire inf.	MET	Mareis
<i>Raja clavata</i>	Rajiformes	Rajidae	14 cm	-	Vertèbre caudale	MET	Mareis
<i>Raja clavata</i>	Rajiformes	Rajidae	14 cm	-	Spécimen entier	Microtomographie	Mareis
<i>Raja sp.</i>	Rajiformes	Rajidae	16 cm	-	Spécimen entier	Microtomographie	Coll. H. Cappetta
<i>Raja asterias</i>	Rajiformes	Rajidae	45 cm	♀	Mâchoire inf.	Histologie	Méditerranée
<i>Raja asterias</i>	Rajiformes	Rajidae	45 cm	♀	Vertèbres caudales	Histologie	Méditerranée
<i>Mobula japonica</i>	Myliobatiformes	Mobulidae	-	-	Mâchoire inf.	Histologie	Coll. G. Notarbartolo di Sciarra

TABLEAU 0.2 – Matériel biologique

Taxon	Ordre	Famille	taille	Sexe	Structure	Utilisation	Origine
<i>Squalus acanthias</i>	Squaliformes	Squalidae	40 cm	♀	Mâchoire inf.	Histologie	Coll. H. Cappetta
<i>Etmopterus cf. spinax</i>	Squaliformes	Etmopteridae	14 cm	♀	Mâchoire inf.	Histologie	Coll. H. Cappetta
<i>Chimaera</i> sp.	Chimaeriformes	Chimaeridae	14 cm	-	Mâchoire inf.	Microtomographie	Coll. H. Cappetta

Annexe B : Protocoles d'histologie

Hémaxoxyline Éosine Safran

Procédure :

Coloration effectuée sur automate de coloration HMS 740

- Déparaffinage
- 5' Rinçage H₂O pure
- 30'' Hémaxoxyline de Mayer 1,5X
- 10' Rinçage H₂O courante
- 5' EtOH 70°
- 5' EtOH 95°
- 5' Éosine alcoolique 0,5%
- 2 x 5' EtOH 100°
- 6' Safran
- 2' EtOH 100°
- 4' EtOH 100°
- 2 x 5' Xylène
- Montage avec du mountex

Solutions :

Hémaxoxyline de Mayer 1,5X (pour 500ml) :

- 0,75 g Hémaxoxyline (Sigma-H3136)
- 500 ml H₂O pure (Aguettant 3293)
- Chauffer à 50°C
- 0,1 g Iodate de sodium (Sigma-S4007)
- 25 g Potassium aluminium sulfate, dodecahydrate (Sigma-31242)
- Agitation jusqu'à dissolution de l'alun
- 0,5 g Acide citrique (Sigma-C1857)
- 25 g Chloral hydrate (Sigma-C8383)

Éosine alcoolique 0,5% (pour 500ml) :

- 2,5 g Éosine (Sigma-E4382)
- 24 ml H₂O pure (Aguettant 3293)
- 457 ml EtOH absolu
- 20 ml Acide acétique glacial
- Safran :
- 5 g Safran (Labonord 11507737)
- 500 ml EtOH absolu
- Incubation O/N à 65°C puis filtration

Trichrome de Masson

Procédure :

- Déparaffinage
- 5' Rinçage H₂O pure
- 1h Liquide de Bouin
- 15' Rinçage H₂O courante
- 2 x 3' Rinçage H₂O pure
- 5' Bleu de Célestine B
- 3' H₂O pure
- 10" Hématoxyline de Mayer 1, 5 X
- 5' Rinçage H₂O courante
- 1' Alcool acétifié 1%
- 2' 30" Solution A
- 3' H₂O pure
- 5' Solution B
- Égouttage
- 5' Solution C
- 3' H₂O pure
- 2' Acide acétique 1%
- 3' EtOH 95°
- 2 x 3' EtOH 100°
- 2 x 3' Xylène
- Montage avec du mountex

Solutions :

Liquide de Bouin :

- 7,5 ml Acide picrique saturé (1, 3% en H₂O pure) (Sigma-239801)
- 2,5 ml Formaldéhyde 37% (Sigma-1635)
- 0,5 ml Acide acétique (VWR-20103.295)

Bleu de Célestine B

- 500 ml H₂O pure (Aguettant 3293)
- 25 g Sulfate ferrique d'ammonium (Sigma-221260)
- Dissoudre sous agitation
- 2,5 g Bleu de Célestine B (Sigma-206342)
- Porter à ébullition pendant 2-3'. Filtrer après refroidissement.
- 70 ml Glycérine (Carlo-Erba-453758)
- Filtrer avant utilisation

Hématoxyline de Mayer 1,5X (pour 500ml) :

- 0,75 g Hématoxyline (Sigma-H3136)
- 500 ml H₂O pure (Aguettant 3293)
- Chauffer à 50°C
- 0,1 g Iodate de sodium (Sigma-S4007)
- 25 g Potassium aluminium sulfate, dodecahydrate (Sigma-31242)
- Agitation jusqu'à dissolution de l'alun
- 0,5 g Acide citrique (Sigma-C1857)
- 25 g Chloral hydrate (Sigma-C8383)

Alcool acétifié 1%

- 1 ml Acide acétique glacial (VWR-20103.295)
- 99 ml EtOH absolu

Solution A : Solution de fuchsine acide 0,5%

- 0,5 g Fuchsine acide (Sigma-F8129)
- 0,5 ml Acide acétique glacial (VWR-20103.295)
- 100 ml H₂O pure (Aguettant 3293)
- Filtrer avant utilisation

Solution B : Solution d'acide phosphomolybdique 1%

- 1 g Acide phosphomolybdique (Sigma-79560)
- 0,5 ml Acide acétique glacial (VWR-20103.295)
- 100 ml H₂O pure (Aguettant 3293)

Solution C : Solution de bleu de méthyle 2%

- 2 g Bleu de méthyle (Sigma-95290)
- 2, 5 ml Acide acétique glacial (VWR-20103.295)
- 100 ml H₂O pure (Aguettant 3293)

Acide acétique 1%

- 1 ml Acide acétique glacial (VWR-20103.295)
- 99 ml H₂O pure (Aguettant 3293)

Réticuline

Procédure :

- Déparaffinage
- 5' Rinçage H₂O pure
- 5' Solution A+B (oxydation)
- Rinçage rapide en H₂O pure (en bain)
- 3' Solution C (blanchiment)
- 2 x 1' Rinçage H₂O pure
- 2' Solution D (mordantage)
- 2 x 3' Rinçage H₂O pure
- 2'' Solution E (imprégnation)
- 2 x 1' Rinçage H₂O pure
- 2' Solution F (réduction)
- 2 x 1' Rinçage H₂O courante
- 4' Solution G (fixation)
- 2 x 5' Rinçage H₂O courante
- 1' Rinçage H₂O pure
- 5' Rouge nucléaire 0,2%
- 1' Rinçage H₂O pure
- 5' EtOH 96°C
- 2 x 5' EtOH 100°
- 2 x 5' Xylène
- Montage en milieu non aqueux

Solutions :

Solution de rouge nucléaire 0,2%

- 5 g Sulfate d'aluminium (Sigma-10843)
- 100 ml H₂O pure (Aguettant 3293)
- Chauffer à 100°C
- 0,2 g Rouge nucléaire (Sigma-60700)

Kit Diapath Argentaffin reticular fibers (010211)

Prêt à l'emploi

Weigert

Procédure :

- Déparaffinage
- 5' Rinçage H₂O pure
- Délimiter la coupe au "pap pen"
- Recouvrir le tissu avec le réactif D "Resorcinol fuchsin"
- Incubation 1h en chambre humide à 46°C
- 5' Rinçage H₂O pure
- 10' Réactif E
- 5' Rinçage H₂O pure
- 3' EtOH 70°
- 3' EtOH 96°
- 2 x 3' EtOH 100°
- 2 x 3' Xylène
- Montage avec du mountex

Solutions :

Kit Diapath Weigert elastic fibers (010217)

Prêt à l'emploi

Acide périodique de Schiff-Bleu alcian

Procédure :

- Déparaffinage
- 5' Rinçage H₂O pure
- 30' Solution de bleu alcian 0,1%
- 5' Rinçage H₂O courante
- 5' Rinçage H₂O pure
- 5' Solution d'acide périodique 1%
- 5" Rinçage H₂O pure
- 15' Réactif de Schiff
- 7' Rinçage H₂O courante tiède
- 10" Hématoxyline de Gills pure
- 2' Rinçage H₂O pure
- 2 x 5' EtOH 100°
- 2 x 5' Xylène
- Montage avec du mountex

Solutions :

Acide périodique 1%

- 1 g Acide périodique (Sigma-P77310)
- 100 ml H₂O pure (Aguettant 3293)

Réactif de Schiff (Merck-06104721)

Prêt à l'emploi

Hématoxyline de Gills (Vector-H3401)

Prêt à l'emploi

Acide acétique 3%

- 3 ml Acide acétique glacial (VWR-20103.295)
- 100 ml H₂O pure (Aguettant 3293)

Solution de bleu alcian 0,1%

- 0,1 g Bleu alcian 8GX (Sigma-A3157)
- 100 ml Acide acétique 3%
- Ajuster le pH à 2,6

Double coloration bleu alcian-rouge alizarine

Procédure :

- 1' Rinçage KOH 0,5%
- 5' solution de rouge alizarine 0,005% (dilution dans du KOH 0,5%)
- 1' Rinçage KOH 0,5%
- 1' Rinçage PBS 1X
- 1' Rinçage EtOH 100%
- 2' Solution de bleu alcian
- 1' Rinçage EtOH 100%
- 1' Rinçage PBS 1X
- Montage avec du mowiol

Solutions :

Solution de bleu alcian 20%

- 20 mg Bleu alcian 8GX (Sigma)
- 70 ml EToH 100%
- 30 ml Acide acétique glacial

Annexe C : Primers et arbres phylogénétiques

Liste des primers utilisés pour *Scyliorhinus canicula*

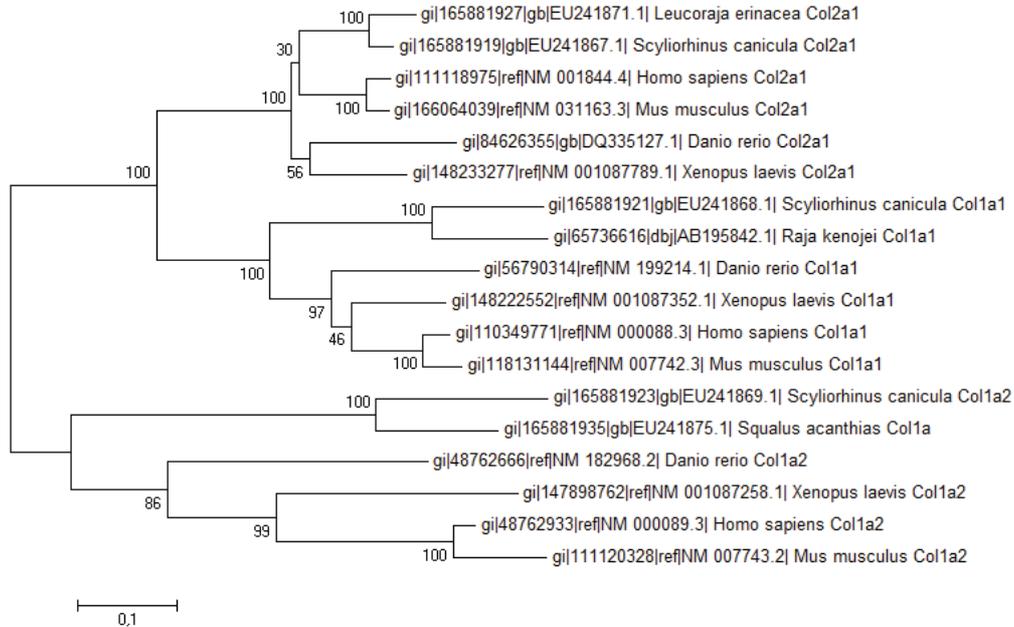
Nom	Primer (5'-3')	Numéro NCBI/Clone
Col1a1-F M13-F	CTGCAGGTGACATTTTGCCA ACACAGGAAACAGCTATGAC	EU241868.1
Col1a2-F Col1a2-R	ATCCTGCTCGCTCATGTCGT TGAAACAGACTGGGCCAATG	EU241869.1
Col2a1-F Col2a1-R	GCTGGTCTATCACAACCTGA ACCTGTATTTCGATGACTGTC	EU241867.1
Col11a1-F M13-F	AAGGACCTCCAGCTATCTCA ACACAGGAAACAGCTATGAC	NL0AAE166YC09RM1
Col11a2-F M13-F	CCTGAAGAGACAATGATGGG ACACAGGAAACAGCTATGAC	NL0AAF8YD15RM1
SPARC-F M13-F	CAAAGGAGGACTGCACTACT ACACAGGAAACAGCTATGAC	EU241888.1
SPARC-Like-F M13-F	TGAGCACCATCTTCACCCTC ACACAGGAAACAGCTATGAC	NL0AAF20YC19RM1. SCF129101291SCF

Liste des séquences utilisées pour les analyses phylogénétiques

Espèce	Gène	Numéro NCBI
<i>Homo sapiens</i>	Collagène 1a1	NM_000088.3
<i>Homo sapiens</i>	Collagène 1a2	NM_000089.3
<i>Homo sapiens</i>	Collagène 2a1	NM_001844.4
<i>Homo sapiens</i>	Collagène 11a1	NM_001190709.1
<i>Homo sapiens</i>	Collagène 11a2	NM_080681.2
<i>Homo sapiens</i>	SPARC	NM_003118.3
<i>Homo sapiens</i>	SPARC-Like	NM_001128310.2
<i>Danio rerio</i>	Collagène 1a1	NM_199214.1
<i>Danio rerio</i>	Collagène 1a2	NM_182968.2
<i>Danio rerio</i>	Collagène 2a1	DQ335127.1
<i>Danio rerio</i>	Collagène 11a1	GQ485665.1
<i>Danio rerio</i>	Collagène 11a2	GQ485666.1
<i>Danio rerio</i>	SPARC	NM_001001942.1
<i>Danio rerio</i>	SPARC-Like	NM_001130605.1
<i>Xenopus laevis</i>	Collagène 1a1	NM_001087352.1
<i>Xenopus laevis</i>	Collagène 1a2	NM_001087258.1
<i>Xenopus laevis</i>	Collagène 2a1	NM_001087789.1
<i>Xenopus tropicalis</i>	SPARC	AY575077.1
<i>Mus musculus</i>	Collagène 1a1	NM_007742.3
<i>Mus musculus</i>	Collagène 1a2	NM_007743.2
<i>Mus musculus</i>	Collagène 2a1	NM_031163.3
<i>Mus musculus</i>	Collagène 11a1	NM_007729.2
<i>Mus musculus</i>	Collagène 11a2	NM_009926.1
<i>Mus musculus</i>	SPARC	NM_009242.5
<i>Mus musculus</i>	SPARC-Like	NM_010097.4
<i>Callorhynchus milii</i>	Collagène 11a1	XM_007887285.1
<i>Callorhynchus milii</i>	SPARC-Like	XM_007891904.1
<i>Leucoraja erinacea</i>	SPARC	EU241889.1
<i>Leucoraja erinacea</i>	Collagène 2a1	EU241871.1
<i>Raja kenoei</i>	Collagène 1a1	AB195842.1
<i>Squalus acanthias</i>	Collagène 1a2	EU241875.1

Arbres phylogénétiques

Des analyses phylogénétiques ont été réalisées pour les gènes d'intérêt de la petite roussette afin de vérifier l'orthologie des séquences correspondantes.

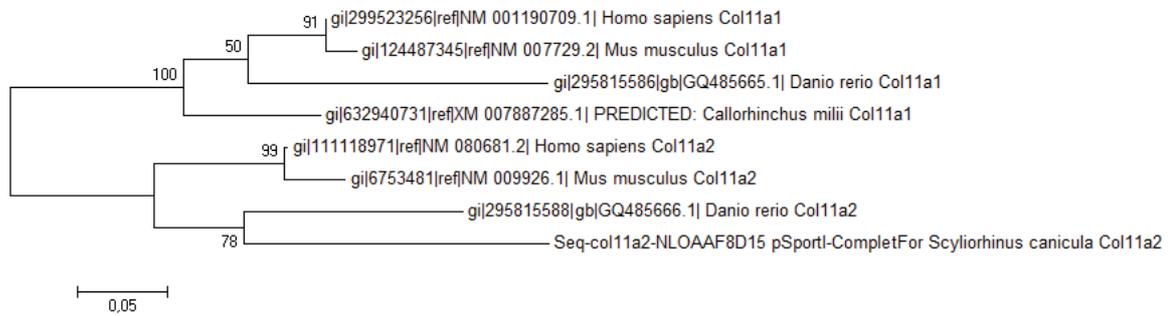


Arbre phylogénétique des collagènes de type I et II

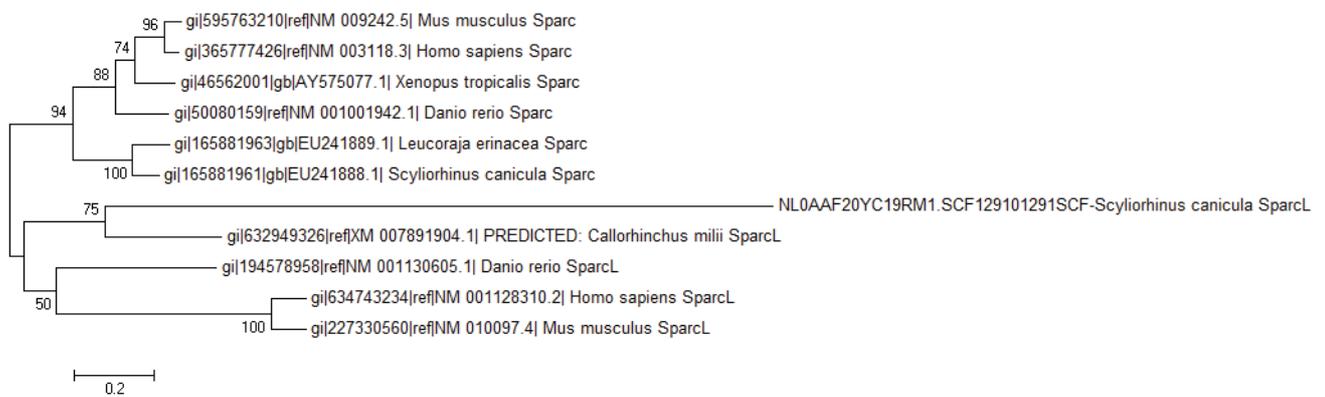
Les clones obtenus pour Col11a1 et Col11a2 étant de très petite taille, il n'a pas été possible de les traiter dans la même analyse phylogénétique. Deux arbres identiques sont donc figurés, illustrant respectivement les collagènes de type XI pour la petite roussette.



Arbre phylogénétique des collagènes de type XI-Col11a1 de Scyliorhinus canicula



Arbre phylogénétique des collagènes de type XI-Col1a2 de *Scyliorhinus canicula*



Arbre phylogénétique des SPARCs.

**Annexe D : Protocole d'hybridation
in situ sur coupes**

Le traitement des échantillons avant inclusion est détaillé dans la partie 2.

Jour 1 :

- séchage des lames 30 minutes à température ambiante
- dilution de la sonde dans le tampon d'hybridation (entre 1/50^{ème} et 1/200^{ème})
- dénaturation de la sonde : 10' à 68°C
- 5' dans la glace puis centrifuger
- Dépôt de la sonde : 300 µl par lame, et recouvrir d'une lamelle
- Incubation en chambre humide : boîte hermétique avec du papier imbibé de formamide 50%
- Incubation O/N à 70°C

Jour 2 :

- Rinçage 10' dans 50% formamide ; 1X SSC ; 0,1% Tween 20 à 70°C
- Rinçages 2 x 30' dans le même tampon chaud.
- Rinçages 2 x 10' dans MABT à température ambiante
- Dépôt de la solution de blocage
- Incubation 1h30-2h en chambre humide
- Dilution de l'Ac antiDig au 1/2000^{ème} dans la solution de blocage et conserver à 4°C pendant l'incubation de la solution de blocage
- Dépôt de 300 µl de la solution d'Ac entre lame et lamelle
- Incubation O/N à 4°C en chambre humide

Jour 3 :

- Rinçages 3 x 15' dans MABT à température ambiante
- Rinçages 4 x 5' dans tampon B3 (à préparer le jour même)
- Dépôt de 300 µl de solution de substrat
- Révélation dans une boîte hermétique à température ambiante (à 4°C si O/N)
- Rinçage 2 x 30' dans H2O
- Séchage des lames et montage avec du mowiol

Solutions :

Tampon d'hybridation :

- 1 ml 10X salt
- 5 ml formamide
- 2 ml 50% sulfate de dextran
- 1 ml yeast tRNA 10mg/ml
- 200 µl Denhardt's 50X
- 800 µl H2O DEPC

10Xsalt :

- 11,4 g NaCl
- 8 ml Tris-HCl 1M
- 2 ml Tris-base 1M
- 780 mg NaH₂PO₄, 2H₂O
- 710 mg NaHPO₄
- 10 ml EDTA 0,5M
- H₂O qsp 100 ml

MABT (150ml) :

- 120 ml H₂O DEPC
- 30 ml MAB 5X
- 150 µl Tween 20

MAB 5X (qsp 1L) :

- 58 g acide maléique
- 44 g NaCl
- H₂O qsp 800ml
- pH 7, 5 avec pastilles NaOH
- Autoclaver

Solution de blocage (pour 8 lames) :

- 0,12 ml blocking reagent (Roche)
- 1,2 ml sheep serum
- 4,68 ml MABT

Tampon B3 (100ml) :

- 10 ml Tris pH 9,5 (1M)
- 2,5 ml NaCl (4M)
- 5 ml MgCl₂ (1M)
- 82,5 ml H₂O MilliQ
- 100 µl Tween 20

Solution de substrat (pour 8 lames) :

- 2,5 ml B3
- 3,5 µl NBT
- 2,75 µl BCIP
- 10 µl lévamisole 0,5M

Les chondrichthyens sont caractérisés par des particularités anatomiques uniques, ce qui, combiné à leur position phylogénétique, en fait un groupe particulièrement attrayant en biologie de l'évolution. Compte tenu de leur squelette cartilagineux, leur registre fossile est principalement constitué de dents isolées, dont la microstructure des tissus est utilisée depuis longtemps dans un contexte taxonomique. Celle-ci permet en effet de différencier les chondrichthyens modernes (néosélaciens) des groupes éteints dans le registre fossile. La microstructure dentaire de nombreux d'entre eux demeure toutefois peu connue, notamment celle des batoïdes, pourtant le groupe de chondrichthyen le plus diversifié à l'heure actuelle.

La première partie de ce travail porte sur une description approfondie de la microstructure dentaire des batoïdes, basée sur un large échantillonnage de formes fossiles et actuelles. Ces observations ont permis de décrire une diversité microstructurale importante et inattendue compte tenu de la stabilité évolutive de ces tissus chez les requins. Cette variation est ensuite abordée à travers une approche histologique et transcriptionnelle du développement dentaire de formes actuelles. Les résultats obtenus suggèrent la convergence de ces tissus avec l'émailloïde présent chez certains ostéichthyens. La troisième partie de ce travail porte sur la calcification du squelette cartilagineux au cours du développement embryonnaire, dans un contexte morphologique et moléculaire. Les modalités de calcification des pièces squelettiques apparaissent ainsi beaucoup plus versatiles chez les chondrichthyens que chez les ostéichthyens.

Mots clés : Chondrichthens, Squelette, Dents, Microstructure, Paléontologie, Développement, Tissus minéralisés

Chondrichthyans exhibit a number of interesting features which make them valuable organisms to investigate from an evo-devo perspective. However, due to their cartilaginous skeleton, isolated teeth are usually the only available fossil material to reconstruct their evolutionary history. Their teeth are covered by enameloid, a hypermineralized tissue whose microstructure has proven a useful taxonomic tool to differentiate between modern forms (neoselachians) and their extinct relatives. However it is poorly known in several groups, thus casting doubts on the validity of such characters.

In this work, I first describe the enameloid microstructure of batoids based on an extensive sampling of both their extant and extinct diversity. I highlight unexpected diversity in the microstructural organization of enameloid which was thought to be very stable in neoselachians. The developmental basis for this diversity was then investigated in two extant chondrichthyan models through classic histological techniques and in situ hybridization. The results highlight differences in their enameloid organic matrix, as well as important differences with enameloid formation in osteichthyans, casting doubts on the homology of the two tissues. Finally I investigate skeletogenesis in the lesser spotted catshark from both a morphological and molecular perspective. Using X-Ray microtomography and in situ hybridization, I highlight both the mineralization sequence of the cartilaginous skeleton and the molecular context in which it calcifies over the course of embryonic development. I find that skeletal calcification in chondrichthyans appears to be much more versatile than in osteichthyans.

Keywords : Chondrichthyans, Skeleton, Teeth, Microstructure, Paleontology, Development, Mineralized tissues