

## Évolution et phylogénie moléculaire des Crustacés.

Pierre Y. Noël

Laboratoire de Biologie des Invertébrés marins et Malacologie (URA n° 699 du CNRS),  
Muséum National d'Histoire Naturelle, 55, rue Buffon, F-75231 Paris cedex 05, France.

**Résumé :** Parallèlement à l'évolution morpho-anatomique, on constate chez les crustacés une évolution moléculaire. Cette évolution semble différer selon les molécules. Quelques séquences de neuropeptides commencent à être connues : une seule RPCH, deux DRPH et deux FMRFamide, plusieurs CHH/MIH/VIH. Il est plus facile d'étudier la phylogénie moléculaire à partir des acides nucléiques ; ce type d'étude est en plein développement, en particulier grâce au séquençage des ARN ribosomiques.

**Abstract :** Morpho-anatomical evolution co-exists with molecular evolution in crustacea. Evolution seems to differ according to molecules. Sequences of neuropeptides begin to be elucidated: one for RPCH, two for PDH and FMRFamide, several for CHH/MIH/VIH. Molecular phylogeny is easier to investigate with nucleic acids (especially with ribosomal RNAs) than peptidic sequencing.

### CRUSTACÉS ET ÉVOLUTION

#### *L'évolution morphologique et biochimique*

Les crustacés présentent de nombreuses formes fossiles dont certaines sont très anciennes, et une grande diversification des formes actuelles. Des schémas évolutifs ont été proposés sur la base de données paléontologiques (Schram, 1986). Les systématiciens travaillant sur la faune actuelle ont été amenés à proposer différents systèmes de classification ; des divergences notables existent quand aux relations phylogénétiques supposées des différents groupes. Tout récemment, l'utilisation des méthodes de cladistique a conduit à des propositions pouvant différer notablement avec des classifications généralement admises (Christoffersen, 1987).

Pendant longtemps, les espèces n'ont été distinguées que par l'examen visuel de leurs formes et de leurs couleurs ; ces dernières sont dues aux propriétés physiques des molécules. Les méthodes "morphologiques" permettent donc déjà d'une certaine façon, de constater l'évolution moléculaire, au moins en ce qui concerne les colorations.

La biochimie comparée n'a été pendant longtemps que d'un intérêt limité pour les études d'évolution. Depuis une vingtaine d'années, d'énormes progrès ont été faits et l'étude des molécules en tant que traceurs de l'évolution est devenue une nécessité, en particulier pour établir les relations entre taxons supérieurs. Deux familles moléculaires différentes peuvent être distinguées (Pasteur & Pasteur, 1980) : les molécules dont la structure est directement corrélable avec celle du gène (acides nucléiques, protéines), et celles dont la structure n'a pas de rapport direct avec celle du gène mais dont la présence a néanmoins une signification héréditaire. La modification du génôme peut se traduire (mais pas toujours) par des modifications au niveau du phénotype (morphologie, embryologie, physiologie). L'étude des relations phylogénétiques doit précéder l'étude du mécanisme de l'évolution.

### *Premières observations concernant molécules et phylogénie*

L'identification de molécules relativement simples dans différents groupes a permis de trouver des différences importantes semblant liées à la position systématique. Ces données sont difficiles à utiliser à des fins phylogénétiques mais elles ont permis très tôt de constater les premières bases de l'évolution moléculaire. Notons à titre d'exemple que le métabolisme glucidique fait intervenir principalement le tréhalose chez les insectes et le glucose chez les crustacés. Les pigments fournissent des exemples plus précis : les ommochromes tégumentaires ne sont présents que dans certains groupes de crustacés ; le métabolisme des caroténoïdes varie selon les groupes : les décapodes sont généralement capables d'oxyder le  $\beta$ -carotène en astaxanthine selon le schéma  $\beta$ -carotène --> échinénone --> canthaxanthine --> phoenicoxanthine --> astaxanthine. Le fait que l'astaxanthine puisse se complexer à des protéines pour faire des caroténoprotéines diversement colorées explique la grande richesse des colorations des décapodes. Les isopodes ne métabolisent le  $\beta$ -carotène que jusqu'à la canthaxanthine. La comparaison des systèmes (dépendant de l'existence ou non de différentes structures morphologiques) conditionnant l'accumulation des métaux lourds a également été utilisé pour une tentative d'évolution phylogénétique des processus de détoxification (Rainbow, 1990). Ces comparaisons qualitatives ou quantitatives n'ont qu'une portée évolutive limitée. Les progrès constants de la biochimie et de la biologie moléculaire appliqués aux crustacés commencent à apporter des résultats exploitables en phylogénie, en particulier grâce au séquençage des peptides, et surtout des acides nucléiques.

### APPORTS DU SÉQUENÇAGE PEPTIDIQUE

La détermination des séquences des protéines a été un peu antérieure à la détermination des séquences des acides nucléiques. De plus en plus de familles de neuropeptides sont connues chez des organismes parfois très éloignés phylogénétiquement. Chez les crustacés, on connaît des séquences de peptides appartenant à au-moins quatre principales familles : 1- "Red Pigment Concentrating Hormones / AdipoKinetic Hormones / HyperTrehalosemic Hormones" (RPCH / AKH / HTH), 2 - "Pigment Dispersing Hormones" (PDH), 3 - "Crustacean Hyperglycemic Hormones / Molt Inhibiting Hormones / Vitellogenesis Inhibiting Hormones" (CHH / MIH / VIH), et 4 - "FMRF-amide".

#### Famille des RPCH / AKH / HTH

Le premier neuropeptide à avoir été séquencé chez les crustacés est la "Red Pigment Concentrating Hormone" (RPCH) de *Pandalus borealis* (Fernelund & Josefsson, 1972). Cet octapeptide disperse le pigment rouge des érythrophones ; il ne semble pas présenter d'évolution ou de variations structurales chez les crustacés, mais il n'a été étudié que chez quelques espèces de décapodes (*Palaemon adspersus* : Carlsen *et al.*, 1976). Par contre chez les insectes, il existe un nombre important de peptides de la même famille, les AKH /

HTH ; près d'une vingtaine sont déjà connus (Penzlin, 1989, Gäde, 1990, Gäde & Kellner, 1990, Gäde & Rinehart, 1990). Leurs fonctions métaboliques y sont plus variées : mobilisation des réserves énergétiques à court terme (mobilisation des lipides lors du vol, activation de la glycogène-phosphorylase des corps gras (Ziegler, 1990), hypertréhalosémie hémolympatique (Hayes *et al.*, 1990), inhibition de la synthèse protéique (Gäde, 1990). Un peptide de la même famille existe chez un mollusque prosobranche (Kuroki *et al.*, 1990). Mentionnons à titre d'exemple les quatre séquences suivantes, dans l'ordre, la séquence de la RPCH de crustacé, une AKH et une HTH d'insecte, et un neuropeptide de mollusque.

pQLNFS PGW.NH <sub>2</sub>	: RPCH	<i>Pandalus</i>
pQLNFS AGW.NH <sub>2</sub>	: AKH II-L	<i>Locusta</i>
pQVNFS PGWG.T.NH <sub>2</sub>	: HTH	<i>Blaberus</i>
APGWG.NH <sub>2</sub>	: neuropeptide	<i>Fusinus</i> .

Il semble qu'au cours de l'évolution une divergence d'action physiologique se soit produite au sein de cette famille de neuropeptides ; chez les arthropodes, les cellules cibles sont toutefois des cellules ayant une fonction dans le métabolisme des lipides. Il serait intéressant de connaître la structure de RPCH chez d'autres Décapodes, chez les Malacostracés et chez les autres crustacés.

#### Famille des PDH

La famille PDH (Pigment Dispersing Hormone) a été l'objet de peu d'études. La séquence de la PDH de *Pandalus borealis* (ou  $\alpha$ -PDH) comporte 18 acides aminés, (Fernlund, 1976) dont 12 sont communs avec la séquence correspondante de la PHH ( $\beta$ -PDH) du crabe violoniste *Uca pugilator* (Rao *et al.*, 1985) et du tourteau *Cancer magister* (Kleinholz *et al.*, 1986). Les séquences sont les suivantes :

NSGMINSILGIPRVMTE A.NH <sub>2</sub>	: $\alpha$ -PDH
NSELINSILGLPKVMND A.NH <sub>2</sub>	: $\beta$ -PDH

Il faudrait étudier cette molécule sur un plus grand nombre d'espèces pour avoir une idée de sa variabilité et de son évolution, mais il est permis de penser que des différences seront trouvées chez d'autres groupes de Décapodes ou de Malacostracés. Une " $\beta$ -PDH-like" molécule existe chez les sélaciens (Vallarino *et al.*, 1990).

#### Famille des CHH / MIH / VIH

Les CHH - MIH - VIH (Crustacean Hyperglycemic Hormone - Molt Inhibiting Hormone-Vitellogenesis Inhibiting Hormone) constituent une famille de neuropeptides assez diversifiée dont les premières séquences viennent d'être publiées. La CHH du crabe *Carcinus* comporte 72 acides aminés (Kegel *et al.*, 1990), la MIH du homard américain *Homarus americanus* en comporte 71 (Chang & *al.*, 1990) et la VIH du homard en comporte 78 (Soyez *et al.*,

1991). Chez l'Isopode *Armadillidium vulgare*, la CHH comporte 73 acides aminés, la séquence de la VIH de la même espèce présente de grandes similarités (Martin *et al.*, 1990). Ces peptides pourraient être apparentés à l'hormone d'éclosion des insectes *Manduca* (Marti *et al.*, 1987), essentiellement par la position des ponts disulfures. La famille des CHH - MIH - VIH présente une évolution sans doute assez grande chez les crustacés malacostracés et chez les Arthropodes.

#### Famille de la FMRFamide

Les peptides de la famille de la FMRFamide et apparentés sont représentés par de nombreuses molécules chez les vertébrés et invertébrés (Trimmer, 1987, De Loof & Schoofs, 1990). Plus d'une douzaine de séquences sont connues chez les arthropodes ; mentionnons par exemple les séquences suivantes :

SDRNFLRFamide	<i>Homarus americanus</i>
TNRNFLRFamide	<i>Homarus americanus</i>
pEDVDHVFLRFamide	<i>Leucophaea maderae</i>
MDSNFI RFamide	<i>Drosophila melanogaster</i>

Les peptides présentent donc une évolution inégale selon les groupes d'Arthropodes et les familles moléculaires. L'intérêt phylogénétique des études des séquences peptidiques est limité en raison des difficultés du séquençage. Plus les peptides sont longs, plus les techniques sont lourdes et onéreuses. De surcroît, des mutations peuvent passer inaperçues en raison de la dégénérescence du code génétique, plusieurs nucléotides pouvant correspondre au même acide aminé. Chaque acide aminé étant codé par 3 nucléotides, il est tout naturel d'examiner les séquences d'acides nucléiques. Ce sont eux qui offrent certainement les meilleures possibilités d'estimer l'évolution moléculaire.

#### APPORTS DU SÉQUENCAGE DES ACIDES NUCLÉIQUES

Différentes techniques ont été développées depuis une vingtaine d'années, rendant de plus en plus facile l'accès aux séquences d'acides nucléiques. On dispose, au niveau du génôme, de nombreux renseignements sur l'évolution. Les avantages de l'étude des acides nucléiques sont indéniables : les caractères sont nombreux, indépendants, quantifiables, les traitements sont "objectifs", et ces caractères existent même si la morphologie est réduite (parasites) ; il existe cependant des problèmes au niveau de l'homologie des gènes étudiés (duplication), et de l'alignement des séquences. Ces méthodes permettent l'accès à une vraie carte d'identité moléculaire.

Les analyses comparatives a but phylogénétique sont surtout développées chez les groupes d'êtres vivants où les données morphologiques sont difficilement accessibles, comme chez les bactéries ou les parasites par exemple. La richesse morphologique des Arthropodes a depuis longtemps permis l'établissement de classifications, mais ces dernières sont discutées. Chez les crustacés, une quarantaine de séquences partielles provenant

d'acides nucléiques (ADN & ARN) ont été publiées, essentiellement chez *Artemia* et des Decapoda.

#### ADN, ARNr 18S & 28S

Les études à finalité phylogénique n'en sont qu'à leur début mais se révèlent très intéressantes. Bien que quelques séquences partielles d'ADN soient à présent connues chez les crustacés, aucune exploitation phylogénétique n'en a été faite. En ce qui concerne les ARN ce sont les ARN ribosomiques qui ont fait l'objet des premières études phylogénétiques. Ainsi, Lazraq (1987) après des études sur des ARNr 28S de différents crustacés a pu proposer un arbre phylogénétique. Abele *et al.* (1989) ont montré que les Pentastomides devaient, d'après les données moléculaires, être rangés dans les crustacés. Kim et Abele (1990) ont obtenu les premières données sur l'ARNr 18S chez *Artemia* et 7 espèces de Décapodes (des genres *Penaeus*, *Procaris*, *Palaemonetes*, *Stenopus*, *Callinectes*, *Procambarus*) et proposé également un arbre. Abele et Kim (1990) ont étudié 37 espèces de crustacés dont 21 décapodes. Le rattachement des Pentastomides aux Crustacés montre que des résultats intéressants sont à attendre de ces nouvelles techniques.

#### APPORTS DES MÉTHODES ELECTROPHORÉTIQUES ET IMMUNOLOGIQUES

Les méthodes électrophorétiques ont été assez peu utilisées pour des études à finalités phylogénétiques chez les crustacés. L'étude du polymorphisme enzymatique apporte des indications évolutives aux niveaux taxonomiques périspécifiques : populations (Flowerdew & Crisp, 1975, Wong & McAndrew, 1990, Stevens, 1990, Juinio *et al.*, 1990), espèces (Macaranas *et al.*, 1990) ou genres (Cosgrove & Lavery, 1990).

Les méthodes en ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) utilisant des anticorps permettent de déterminer des distances immunologiques sur un grand nombre d'échantillons en peu de temps ; elles ont été mises au point chez les vertébrés (Tsutsumi *et al.*, 1989) mais n'ont pas encore été appliquée à des études d'évolution moléculaire ou de phylogénie chez les Crustacés.

#### CONCLUSIONS

Les premières études sur les molécules ont davantage conduit à constater une diversité moléculaire qu'à fournir les bases d'une phylogénie. Les données moléculaires apportent de plus en plus des informations d'une autre nature que celles des données morphologiques classiques ; chaque méthode a ses inconvénients, et il convient de faire une synthèse critique des résultats obtenus pour une meilleure assise d'une phylogénie naturelle des crustacés. Utilisées conjointement, ces données devraient permettre d'améliorer considérablement nos connaissances sur les relations de parentés à tous les niveaux évolutifs. Les techniques

moléculaires ont déjà contribué à d'intéressantes découvertes ; elles peuvent très prochainement apporter des éléments déterminants aussi bien dans la connaissance des relations entre les grands groupes de crustacés qu'à des niveaux taxonomiques inférieurs.

#### INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ABELE, L. G. & W. KIM, 1990. Molecular phylogeny of the crustacea. 3rd International Crustacean Conference, The university of Queensland, Brisbane, Australia, 2-6 juillet 1990, résumé n° 1, p. 21.
- ABELE, L. G., W. KIM & B. E. FELGENHAUER, 1989. Molecular evidence for inclusion of the phylum Pentastomida in the Crustacea. *Molecular Biology and Evolution*, 6, (6) : 685-691.
- CARLSEN, J., M. CHRISTENSEN & L. JOSEFSSON, 1976. Purification and chemical structure of the red pigment-concentrating hormone of the prawn *Leander adpersus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 30 : 327-331.
- CATZEFLIS, F., 1989. Établissement de collections de tissus animaux en vue de l'application de techniques "moléculaires" à la biologie et à la systématique évolutives. *Bull. Soc. Zool. France*, 114 (3) : 5-7.
- CHANG, E. S., G. D. PRESTWICH & M. J., BRUCE, 1990. Amino acid sequence of a peptide with both molt-inhibiting and hyperglycemic activities in the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 171 (2) : 818-826.
- CHRISTOFFERSEN, M. L., 1987. Phylogenetic relationships of Hippolytid genera, with an assignment of new families for the Crangonoidea and Alpheoidea (Crustacea, Decapoda, Caridea). *Cladistics*, 3 (4) : 348-362.
- COSGROVE, M. & S. LAVERY, 1990. Electrophoretic identification of nine sympatric species of penaeid prawn postlarvae. 3rd International Crustacean Conference, The university of Queensland, Brisbane, Australia, 2-6 juillet 1990, résumé n° 26 : 33.
- DE LOOF, A. & L. SCHOOF, 1990. Homologies between the amino acid sequences of some vertebrate peptide hormones and peptides isolated from invertebrate sources. *Comp. Biochem. Physiol.*, B, 95, (3) : 459-468.
- FERNLUND, P., 1976. Structure of a light-adaptating hormone from the shrimp, *Pandalus borealis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 439 : 17-25.
- FERNLUND, P. & L. JOSEFSSON, 1972. Crustacean color-change hormone : amino acid sequence and chemical synthesis. *Science*, 177 : 173-175.
- FLOWERDEW, W. W. & D. J. CRISP, 1975. Esterase heterogeneity and an investigation into racial differences in the cirripede *Balanus balanoides* using acrylamide gel electrophoresis. *Mar. Biol.*, 33 : 33-39.
- GÄDE, G., 1990. The adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone peptide family : structures, interrelationships and functions. *J. Insect Physiol.*, 36, (1) : 1-12.
- GÄDE, G. & R. KELLNER, 1990. Amino acid sequences of dragonfly and mantid adipokinetic hormone. 15th conference of european comparative endocrinologists, 9-14 september 1990, catholic university of Leuven, institute of zoology, Belgium, p. 42.
- GÄDE, G. & K. L. RINEHART, 1990. Primary structures of hypertrehalosaemic neuropeptides isolated from the corpora cardiaca of the cockroaches *Leucophaea maderae*, *Gromphadorhina portentosa*, *Blattella germanica* and *Blatta orientalis* and of the stick insect *Extatosoma tiaratum* assigned by tandem fast atom bombardment mass spectrometry. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 371 : 345-354.
- HAYES, T. K., A. STREY & M. FORD, 1990. Molecular pharmacology and metabolism of insect hypertrehalosemic hormone. 15th conference of european comparative endocrinologists, 9-14 september 1990, catholic university of Leuven, institute of zoology, Belgium, p. 54.
- HILLIS, D. M. & C. MORITZ, eds., 1990. Molecular systematics. Sinauer Associates, Inc., publishers, Sunderland, Massachusetts, USA., 1-588.
- JUINIO, A. R., J. M. MACARANAS & E. D. GOMEZ, 1990. Sympatric occurrence of two subspecies of *Panulirus longipes* and biochemical evidence of their reproductive isolation. 3rd International Crustacean Conference, The university of Queensland, Brisbane, Australia, 2-6 juillet 1990, résumé n° 93, p. 67.
- KEGEL, G., B. REICHWEIN, S. WEESE, G. GAUS, C. PETER-KATALINI & R. KELLER, 1989. Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas*. *FEBS Letters*, 255, (1) : 10-14.
- KIM, W. & L. G. ABELE, 1990. Molecular phylogeny of selected decapod crustaceans based on 18S rRNA nucleotide sequences. *J. Crustacean Biol.*, 10 (1) : 1-13.
- KLEINHOLZ, L. H., K. R. RAO, J. P. RIEHM, G. E. TARR, L. JOHNSON & S. NORTON, 1986. Isolation and sequence analysis of a pigment-dispersing hormone from eyestalks of the crab, *Cancer magister*. *Biol. Bull.*, 170 : 135-143.

- KUROKI, Y., T. KANDA, I. KUBOTA, Y. FUJISAWA, T. IKEDA, A. MIURA, Y. MINAMITAKE & Y. MUNEOKA, 1990. A molluscan neuropeptide related to the crustacean hormone, RPCH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 167 (1) : 273-279.
- LAZRAQ, R., 1987. Phylogénie des ordres et familles de Crustacés à partir du séquençage rapide d'ARNr 28S. D.E.A. de génétique des populations et évolution, option : biologie évolutive, Université Paris VI, 37 p.
- MACARANAS, J., M. J. R. PANTE, A. R. JUINIO & E. D. GOMEZ, 1990. Biochemical taxonomy of spiny lobsters of the genus *Panulirus* and its concordance with morphological classification. 3rd International Crustacean Conference, The university of Queensland, Brisbane, Australia, 2-6 juillet 1990, résumé n° 94 : 67.
- MARTIN, G., O. SOROKINE & A. VAN DORSSELAER, 1990. CHH and VIH a comparison. European network of laboratories : "The neuropeptides of Crustacea : properties and mode of action", Paris, mars 1990, résumé : 21-22.
- PASTEUR, G. & N. PASTEUR, 1980. Les critères biochimiques et l'espèce animale. In "Les problèmes de l'espèce dans le règne animal", *Mémoire n° 40 de la Société Zoologique de France*, 1980, tome III : 99-150.
- PENZLIN, H., 1989. Neuropeptides - Occurrence and function in insects. *Naturwissenschaften*. 76, (6) : 243-252.
- RAINBOW, P.S., 1990. A crustacean phylogeny of heavy metal accumulation. 3rd International Crustacean Conference, The university of Queensland, Brisbane, Australia, 2-6 juillet 1990, résumé n° 133 : 87.
- RAO, K. R., J. P. RIEHM, C. A. ZAHNOV, L. H. KLEINHOLZ, G. E. TARR, L. JOHNSON, S. NORTON, M. LANDAU, O. J. SEMMES, R. M. SATTELBERG, W. H. JORREBY & M. F. HINTZ, 1985. Characterization of a pigment-dispersing hormone in eyes-talks of the fiddler crab *Uca pugilator*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 82 : 5319-5322.
- SCHRAM, F. R., 1986. Crustacea. Oxford University Press, New York and London, 1-606.
- SOYEZ, D., A. J.-P. LE CAER, P. Y. NOËL & J. ROSIER, 1991. Primary structure of two isoforms of the Vitellogenesis Inhibiting Hormone from the lobster *Homarus americanus*. Neuropeptides, sous presse.
- STEVENS, P. M., 1990. Molecular divergence and host relationships in New Zealand representatives of the pea crab genus *Pinnotheres*. 3rd International Crustacean Conference, The university of Queensland, Brisbane, Australia, 2-6 juillet 1990, résumé n° 154 : 97.
- TRIMMER, B. A., L. A. KOBIERSKI, E. A. KRAVITZ, 1987. Purification and characterization of FMRFamide-like immunoreactive substances from the lobster nervous system : isolation and sequence analysis of two closely related peptides. *J. Comp. Neurol.*, 266, (1) : 16-26.
- TSUTSUMI, H., S. NAKAMURA, K. SATO, K. TAMAKI & Y. KATSUMATA, 1989. Comparative studies on an antigenicity of plasma proteins from humans and apes by ELISA: a close relationship of chimpanzee and human. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94B (4) : 647-649.
- VALLARINO, M., M. FEUILLOLEY, K. R. RAO, H. VAUDRY, 1990. Identification of a peptide analogous to a pigment-dispersing hormone ( $\beta$ -PDH) in the pituitary of the cartilaginous fish *Scyliorhinus canicula*. 15 th conference of european comparative endocrinologists, 9-14 september 1990, catholic university of Leuven, institute of zoology, Belgium, p.106.
- WONG, J. T. Y. & B. J. McANDREW, 1990. Allozyme study of population differentiation in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). 3rd International Crustacean Conference, The university of Queensland, Brisbane, Australia, 2-6 juillet 1990, résumé n° 180 : 110.
- ZIEGLER, R., 1990. Roles of adipokinetic hormone in *Manduca sexta*. 15th conference of european comparative endocrinologists, 9-14 september 1990, catholic university of Leuven, institute of zoology, Belgium, p.53.