

Université de Montréal

Morphologie Évolutive et Fonctionnelle des Hémichordés

par

Paul Gonzalez

Département de sciences biologiques
Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en sciences biologiques

Décembre, 2010

© Paul Gonzalez, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Morphologie Evolutive et Fonctionnelle des Hémichordés

Présenté par :
Paul Gonzalez

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Anne Bruneau, président-rapporteur
Dr. Christopher B. Cameron, directeur de recherche
Dr. Bernard Angers, membre du jury

ABRÉVIATIONS UTILISÉES

ACTH	adrenocorticotropic hormone, hormone corticotrope
BSA	bovine serum albumine
FSH	follicle stimulating hormone, folliculostimuline
GH	growth hormone, hormone de croissance
GnRH	gonadotropin-releasing hormone, gonadolibérine
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
POCO	pre-oral ciliary organ, organe pré-oral cilié
LH	luteinizing hormone, hormone lutéinisante
MEB	microscop(i)e électronique à balayage
MET	microscop(ie) électronique à transmission
PBS	phosphate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	scanning electron microscopy
TEM	transmission electron microscopy
TSH	thyroid stimulating hormone, hormone thyroïdienne

RÉSUMÉ

L'embranchement Hemichordata regroupe les classes Enteropneusta et Pterobranchia. Hemichordata constitue, avec l'embranchement Echinodermata, le groupe-frère des chordés. Les entéropneustes sont des organismes vermiformes solitaires qui vivent sous ou à la surface du substrat et s'alimentent généralement par déposivorie, alors que les ptérobranches sont des organismes coloniaux filtreurs habitant dans un réseau de tubes appelé coenecium. Ce mémoire présente trois études dont le point commun est l'utilisation des hémichordés actuels pour répondre à des questions concernant l'évolution des hémichordés, des chordés, et du super-embranchement qui les regroupe, Deuterostomia.

Notre première étude démontre que les fentes pharyngiennes, l'organe pré-oral cilié (POCO) et le pharynx de l'entéropneuste *Protoglossus graveolens* sont utilisés pour l'alimentation par filtration. Le système de filtration de *P. graveolens* permet la capture de particules jusqu'à 1.3 μm , à un débit de 4.05 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$, pour une demande énergétique de 0.009 μW . Les similarités structurales et fonctionnelles avec le système de filtration des céphalochordés suggèrent que la filtration pharyngienne est ancestrale aux deutérostomes.

Lors de notre deuxième étude, nous avons exploré l'hypothèse selon laquelle le POCO des entéropneustes, une structure ciliée pré-buccale au rôle possiblement chémorécepteur, serait homologue au « wheel organ » des céphalochordés et à l'adénohypophyse des vertébrés. Pour cela, nous avons déterminé par immunohistochimie l'expression de *Pit-1*, un facteur de transcription spécifique à ces deux structures, chez l'entéropneuste *Saccoglossus pusillus*. *Pit-1* est exprimé dans des cellules sensorielles du POCO, mais aussi dans des cellules épithéliales distribuées dans le proboscis, collet et tronc. Ce patron d'expression ne permet pas de confirmer ou rejeter l'homologie du POCO et de l'adénohypophyse des vertébrés.

Lors de notre troisième étude, nous avons caractérisé l'ultrastructure du coenecium des ptérobranches *Cephalodiscus hodgsoni*, *Cephalodiscus nigrescens* et *Cephalodiscus densus* par microscopie électronique à transmission et à balayage. *Cephalodiscus* est le

groupe frère de Graptolithina, un groupe qui inclut les graptolithes éteints ainsi que les ptérobranches du genre *Rhabdopleura*. Nous avons décrit les types de fibrilles de collagène présents, leur taille et leur organisation, ainsi que l'organisation globale du coenecium. Nous avons ainsi démontré la présence chez *Cephalodiscus* d'une organisation similaire au paracortex, pseudocortex et eucortex des graptolithes. La présence chez *Cephalodiscus* de ce type d'organisation suggère que le cortex est ancestral à la classe Pterobranchia.

Ces trois études illustrent plusieurs axes importants de la recherche sur les hémichordés, qui en intégrant des données morphologiques, fonctionnelles et moléculaires permet de reconstruire certains événements clés de l'évolution des deutérostomes.

Mots-clés : adénohypophyse, coenecium, deutérostomes, entéropeustes, filtration, organe pré-oral cilié, pharynx, *Pit-1*, ptérobranches, évolution

ABSTRACT

The phylum Hemichordata comprises the classes Enteropneusta and Pterobranchia. Together with echinoderms, hemichordates are the sister-group to chordates. Enteropneusts are worm-shaped solitary deposit feeders. Pterobranchs are colonial filter feeders that live in a secreted collagenous domicile called a coenecium. In this thesis, three studies are presented. These studies are based on observations of extant hemichordates, and address a variety of issues relating to the evolution of hemichordates, chordates, and the superphylum to which they belong: Deuterostomia.

Our first study demonstrates that the gill slits, pre-oral ciliary organ (POCO), and lining of the pharynx of the enteropneust *Protoglossus graveolens* are used in filter feeding. The filter-feeding system of *P. graveolens* enables particle capture down to 1.3 μm , at a rate up to 4.05 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$, with a power consumption of 0.009 μW . Structural and functional similarities with the cephalochordate filter-feeding system suggest that pharyngeal filter-feeding is ancestral to the deuterostomes.

In our second study, we address the hypothesis that the enteropneust POCO, a putative chemosensory structure located anterior to the mouth, is homologous to the cephalochordate wheel organ and vertebrate adenohipophysis. We characterized the expression pattern of the adenohipophysis-specific transcription factor *Pit-1* in the adult enteropneust *Saccoglossus pusillus* with immunohistochemistry. *Pit-1* is expressed in sensory cells of the POCO and in scattered epithelial cells of the proboscis, collar and trunk. This expression pattern does not allow to confirm or reject the homology of the POCO with the vertebrate adenohipophysis.

In our third study, we characterized the ultrastructure of the coenecium of the pterobranchs *Cephalodiscus hodgsoni*, *Cephalodiscus nigrescens* and *Cephalodiscus densus* using transmission and scanning electron microscopy. *Cephalodiscus* is the sister-

group to the Graptolithina, which includes the extinct graptolites and the extant pterobranch genus *Rhabdopleura*. We described the fibril types, size and organization, as well as the general organization of the coenecium. We demonstrated that the coenecium of *Cephalodiscus* shows similarities with the graptolite eucortex, paracortex and pseudocortex. The cortical-like organization of the coenecium of *Cephalodiscus* suggests that the cortex is ancestral to the Pterobranchia.

Together, these three studies illustrate different axes of hemichordate research, and show how integrating morphological, functional and molecular data allows us to infer key events in the evolution of deuterostomes.

Keywords : adenohipophysis, coenecium, deuterostomes, enteropneusts, filter-feeding, pre-oral ciliary organ, pharynx, Pit-1, pterobranchs, evolution

TABLE DES MATIÈRES

Morphologie Évolutive et Fonctionnelle des Hémichordés.....	i
ABRÉVIATIONS UTILISÉES.....	i
RÉSUMÉ.....	ii
ABSTRACT.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
REMERCIEMENTS.....	xii
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE 1.....	4
L'alimentation par filtration chez l'entéropneuste <i>Protoglossus graveolens</i> et l'évolution du pharynx filtreur.....	4
INTRODUCTION.....	5
1. Diversité de l'alimentation par filtration chez les deutérostomes actuels.....	5
1.1. Surfaces externes ciliées.....	5
1.2 Pharynx et fentes pharyngiennes.....	6
1.3. Alimentation chez Enteropneusta.....	7
2. Évolution de l'alimentation par filtration chez les deutérostomes.....	8
3. L'hypothèse du ver à fentes pharyngiennes.....	10
3.1. Fentes pharyngiennes.....	11
3.2. Endostyle.....	11
3.3. Organe pré-oral cilié / wheel organ.....	13
4. La fonction ancestrale des fentes pharyngiennes.....	13
ARTICLE.....	15

The gill slits and pre-oral ciliary organ of <i>Protoglossus</i> (Hemichordata : Enteropneusta) are filter-feeding structures.....	15
CONCLUSIONS	27
CHAPITRE 2.....	29
Localisation du facteur de transcription <i>Pit-1</i> chez l'entéropneuste <i>Saccoglossus pusillus</i> : implications sur l'homologie de l'organe pré-oral cilié des entéropneustes et de l'adénohypophyse des vertébrés	29
INTRODUCTION	30
1. L'organe pré-oral cilié des entéropneustes	30
2. Homologie du POCO et du wheel organ des céphalochordés	30
3. Homologie du wheel organ des céphalochordés et de l'adénohypophyse des vertébrés	31
4. Homologie morphologique et données moléculaires	33
5. Le facteur de transcription <i>Pit-1</i> est-il exprimé dans l'organe pré-oral cilié chez l'entéropneuste adulte <i>Saccoglossus pusillus</i> ?	34
ARTICLE	36
Immunohistochemical localisation of the pituitary-specific transcription factor <i>Pit-1</i> in the adult enteropneust hemichordate <i>Saccoglossus pusillus</i>	36
CONCLUSIONS	44
CHAPITRE 3.....	46
L'ultrastructure du coenecium de <i>Cephalodiscus</i> et l'évolution du coenecium des ptérobranches.....	46
INTRODUCTION	47
1. Structure du coenecium des ptérobranches.....	47
1.1 Organisation du coenecium de <i>Rhabdopleura</i>	47
1.2. Organisation du coenecium de <i>Cephalodiscus</i>	48
2. Homologie du coenecium des ptérobranches et du rhabdosome des graptolithes... ..	50
2.1. Similarités structurales et composition	50
2.2. Ultrastructure du rhabdosome des graptolithes	51

2.3 L'ultrastructure du coenecium des ptérobranches.....	52
3. Phylogénie des ptérobranches et évolution du coenecium	53
ARTICLE	55
<i>Cephalodiscus</i> cortical tissue evolved before the origin of the Graptolithina.....	55
CONCLUSIONS	65
CONCLUSION GÉNÉRALE	67
TABLEAUX.....	72
FIGURES	74
RÉFÉRENCES	105

LISTE DES TABLEAUX

Table 1. Distribution of fibril types in the Pterobranchia

73

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Diversité de Hemichordata	75
Figure 2. Diversité de l'alimentation par filtration chez les invertébrés deutérostomiens	77
Figure 3. Organisation du système de filtration de l'entéropneuste <i>Harrimania planktophilus</i>	79
Figure 4. Trois hypothèse majeures d'évolution des deutérostomes	80
Figure 5. Arbre phylogénétique du super-embranchement Deuterostomia	82
Figure 6. Comparaison du squelette pharyngien des entéropneustes et des céphalochordés	83
Figure 7. Filter-feeding structures in Deuterostomia	84
Figure 8. Filter-feeding structures in <i>Protoglossus graveolens</i>	85
Figure 9. Light micrographs showing the pumping, filtering and digestive system of <i>Protoglossus graveolens</i> during filter feeding	87
Figure 10. Organization of the filter-feeding morphology of <i>Protoglossus graveolens</i>	89
Figure 11. Organe pré-oral cilié (Enteropneusta) et wheel organ (Cephalochordata)	90
Figure 12. Localization of <i>Pit-1</i> immunoreactive cells in the proboscis, collar and trunk of the adult <i>Saccoglossus pusillus</i>	91
Figure 13. <i>Pit-1</i> immunoreactive cells in the pre-oral ciliary organ of <i>Saccoglossus pusillus</i>	93
Figure 14. Western Blot analysis performed on protein extracts from adult <i>Saccoglossus pusillus</i> , using an antibody against <i>Pit-1</i>	94
Figure 15. Coenecium de <i>Rhabdopleura compacta</i>	95
Figure 16. Diversity of coenecial morphology in <i>Cephalodiscus</i>	96
Figure 17. Rhabdosome de graptolithes benthiques (Dendroidea)	97
Figure 18. Schematic representation of three main types of cortical organization in	98

the Pterobranchia

- Figure 19. Arbre phylogénétique de la classe Pterobranchia 99
- Figure 20. TEM micrographs of the coenecium of *Cephalodiscus hodgsoni* and *Cephalodiscus nigrescens* 100
- Figure 21. TEM micrographs of transverse sections through the walls of the coenecium of *Cephalodiscus densus* 102
- Figure 22. SEM micrographs of the coenecium of *Cephalodiscus* 103

REMERCIEMENTS

Je remercie tout particulièrement Chris Cameron, qui a su inspirer mon développement personnel en tant que chercheur, mais aussi en tant qu'être humain. Chris m'a donné confiance en mes capacités en me laissant voler de mes propres ailes et en me considérant pendant ma maîtrise comme son égal. Mes ambitions actuelles sont teintées de son influence, et son soutien dans mes démarches pour la recherche d'un doctorat m'ont été inestimables. Je retiendrai par dessus tout les excellents moments passés avec lui à chasser l'entéropeuste dans les vases insondables du Maine et sur la côte magique du B.C.

Je remercie mes amis de laboratoire Carine Deland et Javier Luque qui ont partagé avec moi la vie dans le labo Cameron et qui me manquent déjà.

Je remercie mes parents pour leur soutien inconditionnel et inestimable dans mes études.

Je remercie également les personnes qui m'ont aidé pendant ma maîtrise, les membres de mon comité-conseil Jean-François Pflieger et Bernard Angers, Louise Pelletier pour son aide précieuse avec la microscopie électronique, Annie Angers et Guillaume Desrochers pour leur collaboration sur le projet Pit-1.

Enfin, je remercie Ha-Loan Phan pour tout le reste.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'embranchement Hemichordata appartient au super-embranchement Deuterostomia, qui inclut également les embranchements Echinodermata, Xenoturbellida et Chordata (Bourlat *et al.*, 2006). Hemichordata comprend les classes Enteropneusta (entéropneustes) et Pterobranchia (ptérobranches). Les hémichordés possèdent un plan d'organisation tripartite, composé d'un prosome antérieur, d'un mésosome intermédiaire, et d'un métasome postérieur. Les entéropneustes (Fig.1A) sont des organismes marins vermiformes de taille variant entre 10 cm et 1 m, vivant sous ou à la surface du substrat. Le prosome est constitué d'un proboscis, utilisé pour s'enfouir et amener les sédiments dont ils se nourrissent jusqu'à la bouche, située entre le prosome et le mésosome. Le mésosome forme le collet, qui abrite la cavité buccale. Le métasome forme un tronc qui contient le tube digestif, perforé au niveau du pharynx par des fentes pharyngiennes (ou fentes branchiales). Les ptérobranches sont des organismes marins coloniaux de petite taille (1-5 mm) qui vivent en commun dans une structure tubulaire collagénueuse appelée coenecium. Les ptérobranches actuels sont divisés en deux genres principaux, *Rhabdopleura* (Fig. 1B) et *Cephalodiscus* (Fig. 1C). Le prosome des ptérobranches forme un bouclier céphalique, utilisé pour la sécrétion du coenecium et la locomotion. Le mésosome, postérieur au bouclier céphalique, s'étend en une série de bras porteurs de tentacules (une paire chez *Rhabdopleura*, entre deux et huit paires chez *Cephalodiscus*) utilisés pour l'alimentation par filtration. Le métasome forme le tronc de l'animal ainsi que le pédoncule qui le relie au stolon de la colonie (*Rhabdopleura*) ou aux individus produit par bourgeonnement asexué (*Cephalodiscus*).

Contrairement aux embranchements Echinodermata et Xenoturbellida, qui ont subi des modifications morphologiques extrêmes depuis leur divergence avec la lignée des chordés (Long & Byrne, 2001; Telford, 2008), l'embranchement Hemichordata est caractérisé par un plan d'organisation qui permet certaines comparaisons avec ceux-ci. C'est pour cette raison que l'étude des hémichordés est généralement orientée vers ce type de comparaisons, qui permettent d'inférer certaines caractéristiques de l'ancêtre commun des deutérostomes, et ainsi retracer certains des évènements qui ont conduit à l'origine du

plan d'organisation des chordés (Cameron *et al.*, 2000). Deux des trois sujets traités dans ce mémoire sont abordés dans cette optique. Le premier porte sur l'alimentation par filtration pharyngienne chez l'entéropneuste *Protoglossus graveolens*. En plus d'apporter de nouvelles données sur la biologie de cette espèce et sur les mécanismes de la filtration chez les entéropneustes, l'existence de ce type d'alimentation au sein d'Enteropneusta permet de mettre en évidence la fonction ancestrale des fentes pharyngiennes chez les deutérostomes. Le deuxième sujet porte sur l'homologie potentielle de l'organe pré-oral cilié des entéropneustes avec le wheel organ des céphalochordés et l'adénohypophyse des vertébrés. Pour tester l'homologie de ces structures, nous avons déterminé les patrons d'expression de *Pit-1*, un facteur de transcription spécifique à l'adénohypophyse des vertébrés, chez l'entéropneuste *Saccoglossus pusillus*. Le troisième sujet ne compare pas les hémichordés aux chordés, mais porte sur le passé évolutif de la classe Pterobranchia. Les ptérobranches sont apparentés à un groupe d'organismes éteints appelés graptolithes, uniquement connus par les restes fossilisés de leur rhabdosome, une structure similaire au coenecium des ptérobranches. L'étude présentée traite de l'ultrastructure du coenecium des ptérobranches du genre *Cephalodiscus*. Les comparaisons entre l'ultrastructure du coenecium de *Cephalodiscus*, de *Rhabdopleura*, et des graptolithes apportent de nouvelles données sur l'évolution du coenecium des ptérobranches.

Ce mémoire est organisé en trois chapitres distincts, traitant successivement de ces trois sujets. Chacun de ces chapitres est divisé en une introduction, un article, et une brève présentation des conclusions de l'étude. Une conclusion générale reprend les résultats principaux des trois études et présente certaines questions soulevées par ces résultats.

CHAPITRE 1

L'alimentation par filtration chez l'entéropneuste
Protoglossus graveolens et l'évolution du
pharynx filtreur

INTRODUCTION

Les invertébrés deutérostomiens sont exclusivement marins, et la plupart d'entre eux s'alimentent par filtration, c'est à dire par l'extraction de particules alimentaires de petite taille de leur environnement aqueux, un milieu hautement dilué (Riisgård & Larsen, 1995). Les deutérostomes utilisent deux types de structures de filtration : des surfaces externes ciliées spécialisées (bras, tentacules, bandes ciliées), ou un pharynx perforé de fentes pharyngiennes. La filtration à l'aide de surfaces externes ciliées est considérée comme ancestrale aux deutérostomes, alors que la filtration pharyngienne est considérée comme un caractère propre aux chordés. Dans ce chapitre, une hypothèse alternative, selon laquelle l'ancêtre commun des deutérostomes s'alimentait par filtration pharyngienne, sera défendue.

1. Diversité de l'alimentation par filtration chez les deutérostomes actuels

1.1. Surfaces externes ciliées

Les échinodermes de la classe Crinoidea (Fig. 2A) et les ptérobranches (Fig. 2B) sont des organismes sessiles ou semi-sessiles qui utilisent la surface de leurs bras et tentacules pour la filtration. Les crinoïdes possèdent cinq bras, bordés par des pinnules recouvertes de nombreux podia (Byrne & Fontaine, 1983). Les podia sont recouverts de papilles, des courtes excroissances adhésives (Byrne & Fontaine, 1983) qui permettent aux podia d'intercepter les particules en suspension (Holland *et al.*, 1986). Une fois capturées par les podia, les particules sont transférées au sillon alimentaire de la pinnule, puis du bras, dont les cils transportent les particules jusqu'à la bouche (Byrne & Fontaine, 1983; Holland *et al.*, 1986).

Les bras des ptérobranches portent de nombreux tentacules. Sur ces tentacules, deux rangées de cils latéraux capturent les particules en suspension et les transfèrent sur la face frontale du tentacule, où les cils frontaux et latéro-frontaux les transportent jusqu'à la surface frontale du bras (Fig. 2B) (Gilmour, 1979; Halanych, 1993). Sur le bras, les particules sont transportées le long d'un sillon cilié médian jusqu'à la bouche du zoïde (Gilmour, 1979; Halanych, 1993). Contrairement à *Rhabdopleura*, le genre *Cephalodiscus* est caractérisé par la présence d'une paire de fentes pharyngiennes, qui pourrait servir à décharger l'eau en excès de l'intérieur du pharynx vers l'extérieur, et ainsi concentrer les particules alimentaires (Gilmour, 1979).

Les échinodermes des classes Holothuroidea et Asteroidea, ainsi que les entéropeustes de la famille Ptychoderidae passent par un stade larvaire planctotrophe appelé collectivement dipleurula. Ce type de larve possède une bande ciliée circum-orale, spécialisée pour la création d'un courant de filtration, la capture des particules en suspension, et leur transfert à la surface ciliée du domaine oral, où elles sont transportées jusqu'à la bouche (Fig. 2C) (Hart, 1991; Lacalli & Gilmour, 2001).

1.2 Pharynx et fentes pharyngiennes

Deux structures généralement vues comme des synapomorphies du groupe des chordés permettent aux chordés invertébrés des sous-embranchements Cephalochordata (Orton, 1913; Riisgård & Svane, 1999; Nielsen *et al.*, 2007) et Urochordata (MacGinitie, 1939; Deibel, 1986; Bone *et al.*, 1997, 2003; Petersen, 2007) de s'alimenter par filtration : les fentes pharyngiennes et l'endostyle. Les fentes pharyngiennes sont des perforations du pharynx qui permettent au courant de filtration de passer du pharynx à un compartiment péripharyngien (atrium) puis vers le milieu extérieur (Fig. 2D, 2E). Les cils latéraux portés par les cellules qui bordent les fentes pharyngiennes sont responsables de la création du courant inhalant. L'endostyle est un sillon cilié et glandulaire situé dans la partie médio-

ventrale du pharynx. Sa fonction est de sécréter un filet muqueux pouvant être hautement structuré (Fig 2F). À sa sortie de l'endostyle, le filet de mucus est transporté dorsalement et postérieurement le long de la surface du pharynx par les cils frontaux qui recouvrent sa surface (Fig. 2F). Il se charge alors de particules alimentaires, et lorsqu'il atteint le sillon dorsal du pharynx, il est enroulé sous forme de corde muqueuse et transporté vers l'oesophage pour être digéré. L'endostyle des chordés filtreurs est homologue à la thyroïde des vertébrés (Ogasawara, 2000).

1.3. Alimentation chez Enteropneusta

La plupart des entéropneustes sont dépositivores (Thomas, 1972). Le mucus sécrété par leur proboscis adhère aux sédiments. Le mélange de mucus et de sédiments forme un feuillet tubulaire qui est transporté par les cils qui recouvrent le proboscis vers la bouche, située ventralement entre le proboscis et le collet. Néanmoins, certaines espèces semblent s'alimenter, au moins de façon facultative, par filtration pharyngienne. L'existence d'un courant inhalant à l'entrée de la bouche a été notée chez *Glossobalanus minutus* (Barrington, 1940) et *Saccoglossus horsti*, ainsi que l'existence d'un comportement d'alimentation par filtration chez *Balanoglossus gigas* (Burdon-Jones, 1962) et chez le juvénile de *Saccoglossus horsti* (Knight-Jones, 1953). Malgré ces observations, la fonction des fentes pharyngiennes chez les entéropneustes est généralement considérée comme respiratoire, même si elles ne sont pas spécifiquement impliquées dans les échanges gazeux chez *Glossobalanus minutus* (Pardos & Benito, 1988), et l'alimentation par filtration est considérée comme secondaire à la dépositivorie (Burdon-Jones, 1962) ou de faible importance (Thomas, 1972). Les mécanismes de filtration, la vitesse des particules et la sélectivité de taille du système de filtration ont été décrits chez l'entéropneuste *Harrimania planktophilus*, un filtreur facultatif (Cameron, 2002b) (Fig. 3). Les cils du pharynx de *Harrimania planktophilus* créent un courant inhalant, qui sort du pharynx par les fentes pharyngiennes puis par les pores branchiaux épidermiques. Les particules en suspension

sont capturées par les cils des barres branchiales (les surfaces endodermiques dorso-latérales du pharynx, situées entre chaque fente branchiale), et transportées vers la partie ventrale du pharynx (pharynx digestif), puis postérieurement vers l'oesophage. Les particules de plus petite taille passent à travers les fentes pharyngiennes.

2. Évolution de l'alimentation par filtration chez les deutérostomes

Le plan d'organisation des chordés invertébrés est associé à un mode de vie libre (queue-post-anale et notochorde permettant de nager) et à l'alimentation par filtration pharyngienne (fentes pharyngiennes et endostyle). L'absence de consensus sur la phylogénie des animaux a favorisé l'apparition au cours du 20^{ème} siècle d'un grand nombre d'hypothèses sur l'origine de ce plan d'organisation. Ces hypothèses sont parfois basées sur des comparaisons avec des taxons aujourd'hui classés parmi les protostomes, tels que les annélides (Delsman, 1922; Raw, 1960; Engelbrecht, 1969), les arthropodes (Gaskell, 1890; Patten, 1890; Raw, 1960), les németes (Jensen, 1988) ou les mollusques (Løvtrup, 1977). D'autres hypothèses, basées sur la reconnaissance des liens de parenté entre les hémichordés, les échinodermes et les chordés, ont été plus largement acceptées. La plupart d'entre elles dérivent le plan d'organisation des chordés d'un ancêtre sessile filtrant à l'aide de bras et tentacules (similaire aux ptérobranches ou aux crinoïdes) et/ou d'une larve planctonique filtrant à l'aide de bandes ciliées (similaire à une larve dipleurula).

Parmi les hypothèses les plus citées sont l'hypothèse de Garstang (1928) (Fig. 4A), de Romer (1967) (Fig. 4B) et l'hypothèse des calcichordés (Jefferies, 1986) (Fig. 4C). Ces hypothèses présument que les bras et tentacules sont plésiomorphiques aux deutérostomes pour deux raisons majeures : 1) ils sont présents chez les ptérobranches, les crinoïdes, ainsi que chez les lophophorates (bryozoaires, phoronides et brachiopodes), et 2) les ptérobranches, les échinodermes, et/ou les lophophorates sont considérés comme occupant une position basale au sein des deutérostomes. De plus, l'hypothèse de Garstang (1928)

propose que la larve dipleurula est ancestrale aux deutérostomes car présente chez les échinodermes et les hémichordés. Nous allons voir que les analyses phylogénétiques les plus récentes n'appuient ni la présence de bras et tentacules, ni la présence de larve dipleurula chez l'ancêtre commun des deutérostomes.

Un arbre phylogénétique des deutérostomes, représentant une synthèse des résultats de nombreuses études (Turbeville *et al.*, 1994; Wada & Satoh, 1994; Cameron *et al.*, 2000; Winchell *et al.*, 2002; Bourlat *et al.*, 2003; Blair & Hedges, 2005; Cameron, 2005; Bourlat *et al.*, 2006; Delsuc *et al.*, 2008; Putnam *et al.*, 2008), est présenté à la figure 5. Deuterostomia comprend les embranchements Xenoturbellida, Hemichordata, Echinodermata et Chordata. Les lophophorates sont placés au sein de Protostomia (dans le groupe Lophotrochozoa) (Halanych *et al.*, 1995; Philippe *et al.*, 2005; Helmkampf *et al.*, 2008; Dunn *et al.*, 2008). Les similarités entre le lophophore des lophophorates et les bras et tentacules des ptérobranches sont donc dues à l'évolution convergente (Halanych, 1996). Hemichordata est le groupe frère de Echinodermata, avec lequel il forme le groupe Ambulacraria, lui-même groupe frère de l'embranchement Chordata (Halanych, 1995; Cameron *et al.*, 2000; Winchell *et al.*, 2002; Cameron, 2005; Bourlat *et al.*, 2006). Le monophylétisme du groupe Ambulacraria implique que la présence partagée de bras et tentacules chez les ptérobranches et les échinodermes ne reflète pas nécessairement la présence de ces structures chez l'ancêtre commun des deutérostomes. En effet, ces structures pourraient également être une synapomorphie de Ambulacraria, ou avoir évolué de façon indépendante chez les ptérobranches et les crinoïdes. De même, la larve dipleurula pourrait être une synapomorphie de Ambulacraria, absente chez l'ancêtre commun des deutérostomes. Hemichordata est composé des classes Pterobranchia et Enteropneusta. Pterobranchia pourrait être le groupe-frère d'Enteropneusta (Winchell *et al.*, 2002; Cameron, 2005; Delsuc *et al.*, 2008) ou placé au sein d'un Enteropneusta paraphylétique, en tant que groupe-frère de la famille d'entéropneustes Harrimaniidae (Halanych, 1995; Cameron *et al.*, 2000; Bourlat *et al.*, 2003). Cette dernière hypothèse confirmerait l'évolution indépendante des bras et tentacules des ptérobranches et des crinoïdes.

L'ancêtre commun des deutérostomes n'était donc pas nécessairement un organisme sessile filtrant à l'aide de bras et tentacules, ni une larve filtrant à l'aide de bandes ciliées. Une hypothèse alternative, compatible avec la phylogénie des deutérostomes, et basée sur la comparaison du plan d'organisation des entéropeustes avec celui des chordés, propose que l'ancêtre commun des deutérostomes était un organisme vermiforme doté de fentes pharyngiennes.

3. L'hypothèse du ver à fentes pharyngiennes

Pour inférer les caractères présents chez l'ancêtre commun des deutérostomes, il est nécessaire d'effectuer des comparaisons entre les chordés et les deutérostomes non chordés. Ces comparaisons sont difficiles à effectuer avec les échinodermes et Xenoturbellida, car leurs plans d'organisation sont hautement dérivés (Long & Byrne, 2001; Telford, 2008). Le plan d'organisation tripartite des hémichordés est lui aussi différent de celui des chordés, mais des similarités au niveau des domaines d'expression des gènes qui organisent les axes antéro-postérieur (Lowe *et al.*, 2003) et dorso-ventral (Lowe *et al.*, 2006) de ces deux groupes permettent leur comparaison. L'axe antéro-postérieur des entéropeustes est alignable avec celui des chordés (Lowe *et al.*, 2003), alors que la face ventrale des entéropeustes (définie par la présence de la bouche) correspond à la face dorsale des chordés (Lowe *et al.*, 2006). La phylogénie présentée à la section précédente implique que toute homologie partagée entre un entéropeuste et un chordé reflète nécessairement la présence de ce caractère chez l'ancêtre commun des deutérostomes. Parmi les caractères potentiellement homologues entre entéropeustes et chordés, trois sont associés à l'alimentation par filtration : les fentes pharyngiennes, l'endostyle et l'organe pré-oral cilié.

3.1. Fentes pharyngiennes

L'homologie des fentes pharyngiennes des entéropeustes et des céphalochordés a été proposée du fait de leurs similarités morphologiques (Bateson, 1886; Hyman 1959; Cameron, 2005; Ruppert, 2005). Chez ces deux groupes, le développement des fentes pharyngiennes se fait par perforation circulaire ou ovale de l'endoderme du pharynx, suivie de la division de cette fente primaire en deux fentes secondaires par la croissance dorso-ventrale d'une barre branchiale secondaire. Les similarités histologiques entre les barres branchiales de ces deux groupes incluent notamment l'arrangement des cils, des vaisseaux sanguins, des nerfs et des podocytes (Ruppert, 2005). Les barres branchiales primaires et secondaires sont soutenues par un squelette collagèneux (Fig. 6). Ce squelette est composé chez les entéropeustes comme chez les céphalochordés d'un type de cartilage unique à ces deux groupes, caractérisé par une origine endodermique, par la présence d'un type de collagène similaire au collagène vertébré de type II et par une structure acellulaire (Rychel *et al.*, 2006; Rychel & Swalla, 2007). Chez les entéropeustes de la famille Ptychoderidae comme chez les céphalochordés, le squelette des barres branchiales adjacentes peut être relié par des synapticules (Fig. 6). En plus de ces similarités morphologiques, l'expression du facteur de transcription Pax1/9 dans l'endoderme des fentes pharyngiennes des entéropeustes (Ogasawara *et al.*, 1999; Okai *et al.*, 2000; Lowe *et al.*, 2003), des urochordés (Ogasawara *et al.*, 1999) et des céphalochordés (Holland *et al.*, 1995; Holland & Holland, 1996), suggère également leur homologie. Enfin, la première paire de fentes pharyngiennes des entéropeustes et des chordés est située à une position identique relativement aux domaines d'expression des gènes organisant leurs axes antéro-postérieur (Lowe *et al.*, 2003; Gerhart, 2006), et dorso-ventral (Lowe *et al.*, 2006; Gerhart, 2006).

3.2. Endostyle

La crête épibranchiale est une région spécialisée du pharynx des entéropeustes qui

forme une bande ciliée médio-dorsale. Tout comme l'endostyle des urochordés et des céphalochordés, elle est composée d'une zone centrale flanquée de plusieurs paires symétriques de bandes de cellules glandulaires histologiquement distinctes (Ruppert *et al.*, 1999). Cette similarité suggère leur homologie. La crête épibranchiale est une structure dorsale, alors que l'endostyle des chordés est ventral, mais ces deux structures sont situées du même côté par rapport aux domaines d'expression des gènes définissant leur axe dorso-ventral (Lowe *et al.*, 2006).

En revanche, trois données suggèrent que les entéropeustes ne possèdent pas d'endostyle, et que les fonctions qui sont spécifiques à l'endostyle des chordés sont prises en charge par la totalité du pharynx chez les entéropeustes. TTF-1 (Thyroid Transcription Factor-1) est un facteur de transcription exprimé dans l'endostyle des urochordés et des céphalochordés, ainsi que dans la thyroïde des vertébrés (Ogasawara, 2000). Chez l'entéropeuste *Ptychodera flava*, l'expression d'un homologue de TTF-1 (NK2.1) n'est pas restreinte à la crête épibranchiale, mais est dispersée dans des cellules localisées sur toute la surface endodermique du pharynx (Takacs *et al.*, 2002). De plus, chez les entéropeustes *Saccoglossus kowaleskii* et *Balanoglossus aurantiacus*, des cellules dispersées sur toute la surface interne du pharynx sont capables de lier l'iode (pour l'intégrer dans un des constituants protéiques du filet muqueux) alors que chez les chordés, la liaison d'iode est assurée exclusivement par l'endostyle (Ruppert, 2005). Enfin, la sécrétion de mucus n'est pas restreinte à la crête épibranchiale chez les entéropeustes, mais est assurée par les cellules glandulaires réparties sur toute la surface du pharynx. L'évolution de l'endostyle dans la lignée des chordés se serait donc produite par la restriction à la région endostyloïde de fonctions assurées ancestralement par la totalité du pharynx (Ruppert, 2005).

3.3. Organe pré-oral cilié / wheel organ

L'organe pré-oral cilié (POCO) est une bande ciliée en forme de U qui entoure le pédoncule du proboscis ventralement et latéralement (Brambell & Cole, 1939). Sa fonction est inconnue, mais sa position, antérieure à la cavité buccale, ainsi que la présence de cils, pourrait indiquer un rôle dans la création d'un courant d'eau à l'entrée de la bouche (Brambell & Cole, 1939). Le POCO pourrait être homologue au wheel organ des céphalochordés et à l'adénohypophyse des vertébrés (Welsch & Welsch, 1978). Cette hypothèse reste à confirmer, et sera traitée dans le deuxième chapitre de ce mémoire.

4. La fonction ancestrale des fentes pharyngiennes

Les données décrites dans les sections 2 et 3 suggèrent que l'ancêtre commun des deutérostomes n'était pas un organisme sessile filtrant à l'aide de bras et tentacules, mais plutôt un organisme vermiforme possédant un pharynx perforé de fentes pharyngiennes, et possiblement un endostyle et un organe pré-oral cilié. Chez les chordés invertébrés, les fentes pharyngiennes servent à l'alimentation par filtration. La présence de fentes pharyngiennes chez l'ancêtre commun des deutérostomes pourrait donc signifier qu'il s'alimentait par filtration pharyngienne, comme les chordés actuels. En revanche, les entéropeustes sont généralement déposivores, et malgré l'occurrence de la filtration pharyngienne chez quelques espèces, la fonction de leurs fentes pharyngiennes est généralement considérée comme respiratoire. Afin d'appuyer l'hypothèse selon laquelle l'ancêtre commun des deutérostomes utilisait son pharynx et ses fentes pharyngiennes pour s'alimenter par filtration, nous avons rapporté l'occurrence de filtration pharyngienne chez l'entéropeuste *Protoglossus graveolens*, décrit en détail les paramètres du système de filtration (paramètres du courant inhalant, mécanismes de création du courant inhalant et de capture des particules, consommation énergétique, et sélectivité de taille) et comparé ce

systeme à celui utilisé par les céphalochordés. Nos observations nous ont également permis de déterminer la fonction de l'organe pré-oral cilié de *Protoglossus graveolens*, et de décrire son rôle dans la création d'un courant inhalant.

ARTICLE

The gill slits and pre-oral ciliary organ of *Protoglossus* (Hemichordata : Enteropneusta) are filter-feeding structures

PAUL GONZALEZ & CHRISTOPHER B. CAMERON

Article accepté le 24 juin 2009 et publié le 23 novembre 2009 dans le journal :
Biological Journal of the Linnean Society 98: 898-906.

Abstract

Observations on the hemichordate worm *Protoglossus graveolens* demonstrate that the gill slits, pre-oral ciliary organ (POCO), and the lining of the cylindrical pharynx are used in filter feeding. Pumping of water is generated by cilia that line the lateral gill bars and the POCO directs water from the dorsal surface of the proboscis to the mouth. Particles are trapped and concentrated on the primary and secondary gill bars and transported ventrally and posteriorly by cilia that line the pharynx. The oesophageal organ functions as a barrier to water flow and to squeeze excess water from the mucus-food cord. Particles that passed freely through the gill pores were a maximum of 1.28 μm in size. Diluted milk entered the mouth and was pumped through the pharynx at a rate up to 4.05 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$. The Reynolds number and propulsive efficiency of the filter-feeding structures are estimated using algebraic models. *Protoglossus* elegantly orchestrates the movements of food particles captured by simultaneous filter feeding and deposit feeding or may, from one moment to the next, switch back and forth between deposit and filter feeding. Structural and functional similarities with the cephalochordate pharynx suggest that a wheel organ/POCO and a filter-feeding pharynx may have been present in the common ancestor to the deuterostomes.

Introduction

There exist two prevailing hypotheses on the filter-feeding structure that is ancestral to the deuterostomes. The first suggests that filter-feeding *tentacles* are ancestral because they are expressed, in almost identical form, in crinoids (arms and tube feet) and pterobranch hemichordates (arms and tentacles) (Romer, 1967; Jefferies *et al.*, 1996) (Fig. 7). The second hypothesis submits that filter-feeding ciliary bands are ancestral because of their common occurrence on the surface of enteropneust hemichordate larvae (tornaria) and the larvae of many echinoderms (Garstang, 1928; Lacalli & West, 1993; Nielsen, 1999; Nielsen & Hay-Schmidt, 2007) (Fig. 7). A third hypothesis

deuterostome may have filtered food by creating a unidirectional flow through a chordate-like pharynx, perforated with gill slits, has not been explored, despite the likeness of the enteropneust–hemichordate pharynx to that of cephalochordates (Ruppert *et al.*, 1999; Cameron, 2005). Although structurally similar, their homology has been dismissed for two reasons. First, the pterobranch hemichordates, which use tentacles to filter feed, are regarded as the primitive clade of hemichordates. Second, enteropneusts are assumed to be deposit, not filter feeders (Knight-Jones, 1953; Burdon-Jones, 1962; Thomas, 1972); thus, tentacles (or ciliary bands) are primitive and the pharynx is likely to be convergent in the enteropneusts and chordates. Molecular phylogenetic studies of hemichordates, however, indicate that the Pterobranchia may be the sister group to the Enteropneusta (Winchell *et al.*, 2002; Cameron, 2005; Delsuc *et al.*, 2008) or derived within Enteropneusta (Halanych, 1995; Cameron *et al.*, 2000; Bourlat *et al.*, 2003). It is therefore reasonable to advance the hypothesis that a pharynx with gill slits, *used in filter feeding* is ancestral to deuterostomes. Support for this hypothesis, however, requires a demonstration of chordate-like filter feeding in enteropneusts.

Evidence of filter feeding in the Enteropneusta first came from Barrington (1940) who observed carmine particles passing into the mouth of *Glossobalanus minutus* Kowalevsky, 1866, and observations on the directions of flow and beating cilia along the proboscis, pre-oral ciliary organ (POCO), pharynx, and gill bars of *Saccoglossus horsti* Brambell, Rogers & Goodhart, 1941 (Knight-Jones, 1953). Burdon-Jones (1952) described the filter-feeding behaviour of juvenile *S. horsti*, and the sieving of material from the respiratory current in *Balanoglossus gigas* Muller, 1893 (Burdon-Jones, 1962). Cameron (2002b), described suspension feeding mechanisms by *Harrimania planktophilus* Cameron, 2002, and quantified particle velocity and size-selectivity. Despite these observations, the gill slits are regarded as respiratory (Knight-Jones, 1953), even though they are not specifically involved in gas exchanges in *G. minutus* (Pardos & Benito, 1988) and filter feeding is regarded as being of secondary (Knight-Jones, 1953; Burdon-Jones, 1962) or of little importance (Thomas, 1972) to deposit feeding.

The U-shaped POCO is situated on the posteroventral end of the enteropneust proboscis just anterior to the mouth. Suggestions that it may be sensory (Brambell & Cole, 1939) or an organ of taste (Knight-Jones, 1953) are reasonable given its position in front of the mouth and that it is underlain by a thickened nerve plexus (Welsch & Welsch, 1978). The POCO of *S. horsti* and *Saccoglossus cambrensis* Brambell, Rogers, & Goodhart, 1939, capture particles on a mucous cord during deposit or suspension feeding, further supporting the hypothesis that it may be a chemoreceptive organ (Burdon-Jones, 1962). Although ubiquitous among the enteropneusts, its functional role remains largely unknown.

The genus *Protoglossus* (family Harrimaniidae), as the name implies, is presumed basal among Enteropneusta because of its simple morphology (Burdon-Jones, 1956), and therefore may provide some insight to the evolution of the filter-feeding pharynx in the deuterostomes. The present study aimed: (1) to determine that *Protoglossus graveolens* Giray and King, 1996 filter feeds using its pharynx and gill slits; (2) to determine the particle size selectivity and rate of flow into the mouth; (3) to provide a simple fluid dynamic model to estimate the energy requirements of operating the pharyngeal pump; and (4) to determine the function of the POCO.

Materials and methods

Protoglossus graveolens was collected from Lowes Cove (43°56'N, 69°34'W), a tidal mudflat in the Damariscotta River estuary, Maine. Specimens were kept in their natural sediments in an aquarium under a flow of ambient seawater. One at a time, 20 worms were removed from their sediment and placed in a dish where they were cleaned of sediment and fed orange-coloured plastic particles (Dayglo Color Corp.) or diluted milk, in order to visualize and record the current entering the mouth and pharynx and exiting the gill pores. Particle velocity was measured for three individuals using still images taken at a regular interval and analysed with IMAGEJ (Abramoff, Magelhaes & Ram, 2004). Particle size was recorded from particles entering the mouth, and exiting the gills. Size selectivity

was determined by comparing the size range of particles fed with those escaping the gill pores. Videos and photographs were taken with a QImaging Retiga 2000 camera mounted on an Olympus SZX16 microscope. Particle movement inside the pharynx was observed through the gill pores and through the body wall. Five specimens were relaxed for 10 min in 7% MgCl₂ and, after being fed, were pinned and dissected open with a longitudinal incision along the dorsal or the ventral midline. Observations on particle retention and transport in the pharynx were thus corroborated post-interception, so that dissection could not interfere with particle capture. Measurements of mouth diameter, pharynx length, and the number of gill pores were taken for each worm filmed and were used to calculate:

(i) the Reynolds number:

$$Re = lU/\nu$$

where l is the inside diameter of the pharynx (m), U is the flow velocity (m.s⁻¹) at the entrance to the mouth, and ν is the kinematic viscosity of seawater ($= 1.047 \pm 10^{-6}$ m.s⁻¹ at 20 °C) (Vogel, 1994).

(ii) the resistance to flow through the pharyngeal cylinder:

$$R = 8 l / \pi a^4$$

where l is the length of the pharynx (m), a is the inside radius of the pharynx (m), and η is the dynamic viscosity of seawater ($= 1.072 \pm 10^{-3}$ Pa.s⁻¹ at 20 °C) (Vogel, 1994).

(iii) the power consumption P (W) of the pharyngeal pump:

$$P = Q^2 R$$

where Q is the volumetric flow rate ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) and R is the resistance through the pharynx.

For scanning electron microscopy, the proboscis and dorsal pharynx were dissected and fixed in 4% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4 and postfixed in 1% osmium tetroxyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer. They were then dehydrated through a graded series of ethanol solutions, followed by critical point drying. After sputter coating with an alloy of gold-palladium, the specimens were examined with a JEOL-JSM 35S scanning electron microscope. Cilia length were measured on the proboscis, POCO, pharynx and gill slits.

Results

Structure of the POCO

The POCO of *P. graveolens* is a U-shaped structure situated on the postero-ventral end of the proboscis, in a small depression encircling the ventro-lateral stalk (Fig. 8A). The POCO is delimited by a continuous elevated ridge covered by a dense boundary of long cilia (mean length = 25 ± 3 mm, $N=10$). This ciliated band encircles a central ciliated field of shorter cilia (mean length = 11 ± 2 mm, $N=10$) (Fig. 8B, C). On the ventral midline where the two lateral branches of the U converge, the POCO has an inverted heart shape (Fig. 8A). At this medial spot, the dorsal bands meet and their cilia face each other (Fig. 8D).

Structure of the gut

Protoglossus worms are fragile and commonly break during collection but in the most complete animals, where the pharynx, oesophagus, and a large portion of intestine were present, the pharynx represented approximately 40% of the total length of the trunk. Gill slits and their associated external gill pores are numerous: 114.7 ± 21.0 ($N=7$) and evenly spaced every 0.21 ± 0.04 mm ($N=20$). Primary gill bars and secondary (tongue) bars

are not interconnected by collagenous bridges (synapticles) (Fig. 8E). The gill bars form the dorso-lateral walls of the pharynx lumen and on their lateral sides are a thin band of long cilia (mean length = 14 ± 2 mm, $N=10$) (Fig. 8F, inset). Shorter cilia (mean length = 6 ± 1 mm, $N=10$) cover the frontal face of the primary and secondary gill bars (Fig. 8F).

Observations on filter feeding and particle transport

When in the presence of sediment, *Protoglossus* can deposit feed and filter feed simultaneously. Deposit feeding is achieved by the muscular proboscis which traps particles on a secreted tube shaped mucous sheet. The mucus and particles are transported posteriorly in a conveyor belt fashion on a ciliated epidermis. As the mucous tube approaches the mouth and collar, it may enter the mouth or pass directly over the mouth onto the muscular collar. The posterior transport of the mucous tube stops at the junction with the trunk where it would otherwise block water from passing out the gill pores. To simultaneously filter feed, two well-defined grooves on the posterior proboscis, one dorsal and one ventral, create a temporary gap in the mucous tube through which suspended particles pass.

When only filter feeding, the mouth of *Protoglossus* functions like an inhalant siphon (Fig. 9A, B). Plastic particles (0.1–2.5 mm, average 0.78 ± 0.57 mm, $N=100$) placed up to 4 mm away accelerate as they are sucked towards the mouth. Maximum velocities at the entrance to the mouth varied between individuals in the range 1.80–4.05 $\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$ (mean $v_{\text{max}} = 3.19 \pm 1.21$ $\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$, $N=3$). The Reynolds number in the pharynx is approximately 13, which means the flow is laminar and dominated by viscous forces. The average mouth area A_{buc} is 9.46 ± 1.15 mm^2 ($N = 3$). Average estimated pumping rates (volumetric flow rates) are $P = v_{\text{max}} \cdot A_{\text{buc}} = 0.031 \pm 0.013$ $\text{mL} \cdot \text{s}^{-1}$ ($N=3$). The resistance to flow through the pharynx is $R = 9.29 \cdot 10^6 \pm 2.08 \cdot 10^6$ $\text{Pa} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}$ ($N=3$). The power output of the water pumping system is $P = 0.009 \pm 0.006$ μW ($N=3$). Dynamics of particles at the entrance to the mouth show a velocity profile, where the highest flow is at the center and decreases to zero at the wall of

the buccal cavity. After removal of the proboscis, including the POCO, a weak pumping action is observed ($v_{\max} = 0.34 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$, $N=1$) but the velocity profile is similar. This velocity profile suggests that cilia on the gill slits drive the flow and not cilia that line the walls of the pharynx.

The POCO functions to draw particles from the dorsal and lateral sides of the proboscis stalk to the ventral side and to eject these particles into the inhalant flow of the mouth (Fig. 10). All cilia in the region of the POCO, including those on the posterior face of the proboscis and on the proboscis stalk (posterior to the POCO), beat in the direction of the POCO. This arrangement of cilia beating transports particles along the epidermis to the POCO where they are then ejected into the inhalant flow of the mouth. At the ventral midline, where cilia from the dorsal bands face each other, it creates vortices that also propel particles into the feeding current (Fig. 9C). Filtered water and small particles (minimum size: $0.1 \mu\text{m}$, maximum size: $1.28 \mu\text{m}$, average size: $0.78 \pm 0.40 \mu\text{m}$, $N=100$) pass through the gill slits and atrial cavities and exit via the epithelial gill pores (Fig. 9D, 10). We were unable to observe interception of suspended particles but presume that this is achieved by the dense lateral gill bar cilia. Observations through the gill pores and from dissected specimens clearly show that the frontal cilia are responsible for the ventral transport of trapped particles over the parabranial ridges to the ventral digestive pharynx (Fig. 10). Mucus secreted from the pharynx wall traps the food particles and, in the ventral digestive pharynx, forms a mucus-food cord that is then transported posteriorly to the muscular oesophagus (Fig. 9E). Situated between the pharynx and intestine, the muscular oesophageal organ (Fig. 9F) functions as a plug to water flow into the intestine, to squeeze excess water from the food, and probably to macerate food particles before they enter the digestive intestine. In the most complete specimen (pharynx length = 11.8 mm , oesophagus + intestine length = 18.3 mm), the passage time through the trunk was 3 h 25 min.

Discussion

A facultative filter feeder, *Protoglossus* is able to deposit feed and filter feed simultaneously. It feeds on particulate matter in the same size range as many filter feeders and at relatively low energetic cost. It filters particles even less than 1.3 μm in size, which is the approximate minimal size filtered by the enteropneust *H. planktophilus* (Cameron, 2002b). The mucous net sieving of ascidians and lancelets enable particle capture down to 2–3 μm and 0.06 μm in size, respectively (Ruppert *et al.*, 2000). Our mathematical model of the power demand of the *P. graveolens* pumping system suggests that it is much lower (0.009 μW) than that of the sponge *Haliclona urceolus* Rathke & Vahl, 1806 (0.677 μW), polychaetes (0.451 μW), bivalves (*Mytilus edulis* Linnaeus, 1758; 10 μW), and ascidians (*Styela clava* Herdman, 1881; 2.3 μW) (Riisgård & Larsen, 2000). This low calculation is the result of a low volumetric flow rate. Because no data exist on the respiratory physiology of enteropneusts, we are unable to estimate the total metabolic power expenditure (R_t) of *Protoglossus* to calculate the overall efficiency P/R_t of the pumping system for comparison with other filter feeders.

Similar to *G. minutus* (Pardos, 1988) and cephalochordates (Ruppert *et al.*, 2004) the pumping activity in the pharynx of *Protoglossus* is maintained by long cilia that line the lateral edges of the gill bars and beat orthogonally to their surface. Short cilia that line the frontal face of the gill bars transport mucus and trapped food particles to the ventral (dorsal in cephalochordates) digestive pharynx. The velocity profile observed at the entrance of the mouth suggests that gill bar cilia pump the water: if the cilia covering the pharynx walls were responsible for creating the current, the highest velocity would be seen along the buccal walls, and not at the centre of the cylindrical pharynx. Observations of orange particles through the body wall and gill pores corroborate observations from dissected specimens: trapped particles are transported ventrally to the digestive gut. The food and sediment laden mucous cord is then transported posteriorly to the oesophageal organ and intestine. *Protoglossus* lacks the mucous net and endostyle that characterize the chordate

pharynx (but see also Ruppert *et al.*, 1999), although recent phylogenetic studies that place Cephalochordata as basal chordates (Delsuc *et al.*, 2008; Putnam *et al.*, 2008) make further comparative studies with the enteropneusts germane.

The enteropneust POCO may be homologous to the wheel organ of cephalochordates and in part to the vertebrate adenohiphysis (Welsch & Welsch, 1978). Similar to the wheel organ, the POCO is ectodermal (Goodrich, 1917), and composed of columnar cells (Fig. 8B) (Sahlin & Olsson, 1986) that form a ciliated band and is positioned anterior to the buccal cavity. These organs function to transport suspended particles towards the mouth. In enteropneusts, the POCO is U-shaped and envelopes the proboscis stalk ventrally and laterally, whereas, in adult cephalochordates, the band is elongate and sinuous. A thickening in the nerve plexus under the POCO suggests a sensory function (Welsch & Welsch, 1978). The long peripheral cilia create a feeding current that transports particles from the dorsal and lateral proboscis to the ventral midline where they are then ejected into the incurrent flow to the mouth. Unlike the wheel organ, the POCO of *Protoglossus* does not transport particles from the ciliary field to the mouth on a mucous cord, although this method of particle transport has been described for the POCO of *S. cambrensis* (Knight-Jones, 1953) and *B. gigas* (Burdon-Jones, 1962). Further research using ultrastructure, protein, and gene expression are needed to support the potential homology of the wheel organ and the POCO.

Protoglossus uses the gill slits and pharynx to filter feed much in the same way as protochordates. Increasing evidence provided by comparative morphology, development, and gene expression data supports the hypothesis that the gill slits were present in the ancestor to hemichordates and chordates. The *pax1/9* orthologue is expressed in the gill endoderm of the adult enteropneust *Ptychodera flava* Eschscholtz, 1825 (Ogasawara *et al.*, 1999), juvenile *Saccoglossus kowalevskii* Agassiz, 1873 (Lowe *et al.*, 2003), and chordates (Neubuser *et al.*, 1995). The posterior expression of the *otx* domain is at the first pair of gill slits in chordates and *Saccoglossus* (Lowe *et al.*, 2003). Supporting the dorsal–ventral

inversion hypothesis is the expression of the nk-2 class genes in dorsal pharyngeal endoderm of *Saccoglossus* (Lowe *et al.*, 2006) and the ventral pharynx of a cephalochordate (Holland *et al.*, 2003). Moreover, the gill bars of hemichordates and cephalochordates are composed of acellular invertebrate type II collagen (Cameron, 2005; Rychel *et al.*, 2006).

Recent progress in the molecular phylogenetic position of the deuterostomes suggest that *Xenoturbella*, an unusual marine worm lacking a through gut, coelomic cavities, and gill slits, is a possible stem group ambulacrarian (Bourlat *et al.*, 2003). If this is true, then either the through gut and gill slits of chordates and hemichordates are homoplasious or have been lost in the branch leading to *Xenoturbella*. Three lines of evidence support the latter hypothesis. The first is the mounting molecular developmental evidence cited above for shared gene expression domains in enteropneusts and chordates (Lowe *et al.*, 2003, 2006); the second is that *Xenoturbella* arguably lost these structures because it is likely a consumer of mollusks (Bourlat *et al.*, 2003; Telford, 2008); and the third is the presence of gill slits, coelomic cavities, and complete gut in fossils of basal deuterostome vetulicolians (Shu *et al.*, 2001) and carpodid echinoderms (Jefferies, 1986; Dominguez *et al.*, 2002).

Sufficient data have emerged to make some general observations on filter feeding in the Enteropneusta. By contrast to the report of Knight-Jones (1953), who detected a current entering the burrow of *S. horsti*, and Burdon-Jones (1952) who observed the filter-feeding behaviour in juveniles of the same species, we have not observed filter feeding in adult *Saccoglossus pusillus* Ritter, 1902, *Saccoglossus bromophenolosus* King, Giray & Kornfield, 1994, or *S. kowalevskii* suggesting that adult *Saccoglossus* generally do not filter feed. This genus, characterized by a long proboscis, is a specialized surface deposit feeder. The filter feeders *H. planktophilus* (Cameron, 2002a), *B. gigas* (Burdon-Jones, 1962) and *P. graveolens* have a short proboscis and do not appear to construct permanent burrows that open into the water column. Unlike most filter feeders, which are pelagic or epifaunal,

these animals instead exploit interstitial pore water in the same respect as lamprey larvae and cephalochordates (Mallatt, 1982; Ruppert *et al.*, 2000). Nothing is known of the feeding biology from the enteropneust families Spengeliidae, Saxipendidae, and Torquaratoridae; thus, we are unable to determine the number of losses or gains of filter feeding in the Enteropneusta. The most current hemichordate phylogenies are incongruent (Cameron *et al.*, 2000; Winchell *et al.*, 2002; Cameron, 2005) and grossly undersampled but, as filter feeding is known in the morphologically most complex genera (*Balanoglossus*: family Ptychoderidae) and the most simple (*Protoglossus*: family Harrimaniidae), it thus appears to be an ancient trait, perhaps as old as the protodeuterostome.

Acknowledgments

The director and staff of the Darling Marine Center are gratefully acknowledged for their assistance during our stay at the facility. This study was supported by NSERC discovery grant R0014254 (C.B.C.).

CONCLUSIONS

L'entéropneuste *Protoglossus graveolens* est un filtreur facultatif capable de s'alimenter simultanément par filtration et par déposivorie, ou d'alterner entre ces deux modes d'alimentation. Tout comme l'entéropneuste *Harrimania planktophilus*, le système de filtration de *P. graveolens* lui permet de capturer des particules aussi petites que 1.3 μm (pico-plancton), ce qui correspond approximativement à l'efficacité de capture des ascidiens (Bone *et al.*, 2003), elle-même inférieure à celle du filet muqueux des céphalochordés (0.06 μm) (Nielsen *et al.*, 2007). Notre estimation de la consommation énergétique associée au pompage d'eau dans le pharynx de *P. graveolens* suggère qu'elle est considérablement plus faible que la demande énergétique des systèmes de filtration des éponges, des polychètes, des bivalves et des ascidiens (Riisgård & Larsen, 2000). Cette faible valeur est due à un faible débit volumétrique comparé à ces autres organismes filtreurs. Toutefois, l'absence de données physiologiques chez les entéropneustes nous empêche de comparer cette valeur au métabolisme total de l'organisme (R_t), et ainsi d'estimer l'efficacité totale du système de pompage (P/R_t).

Tout comme chez les céphalochordés (Orton, 1913; Riisgård & Svane, 1999; Ruppert *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2007), le pompage d'eau à travers le pharynx de *Protoglossus* est assuré par les longs cils qui bordent les faces latérales des barres branchiales et battent de façon orthogonale à leur surface. Chez *Protoglossus*, le mucus responsable de la capture des particules est produit par les cellules épithéliales de la surface interne du pharynx. Le mucus chargé de particules est enroulé sous forme de cordon muqueux, est transporté ventralement par les courts cils frontaux des barres branchiales, avant d'être transporté postérieurement vers l'oesophage pour être digéré. Les particules de taille inférieure à 1.3 μm passent librement à travers les fentes pharyngiennes, et sortent avec le courant exhalant par les pores branchiaux. Tout comme le wheel organ des céphalochordés, l'organe pré-oral cilié de *Protoglossus* participe à la création du courant de

filtration. Les longs cils qui bordent la périphérie du POCO transportent les particules en suspension des faces dorsales et latérales du proboscis vers la cavité buccale ventrale, où elles sont éjectées dans le courant inhalant créé par les cils des fentes pharyngiennes. La fonction de cette structure chez les entéropneustes non filtreurs ainsi que son homologie potentielle avec le wheel organ des céphalochordés restent à élucider.

Ces données viennent compléter nos connaissances fragmentaires sur la filtration pharyngienne chez Enteropneusta. Les entéropneustes filtreurs *Harrimania planktophilus* (Cameron, 2002a), *Balanoglossus gigas* et *Protoglossus graveolens* semblent ne pas construire de tunnels permanents ouverts sur la colonne d'eau. Contrairement à la plupart des organismes filtreurs qui sont pélagiques ou épifaunaux, ces entéropneustes filtreurs exploitent l'eau interstitielle des sédiments, tout comme les céphalochordés et les larves de lamproie. Malgré l'absence d'endostyle et de filet muqueux structuré chez ces entéropneustes, ils utilisent leur pharynx et leurs fentes pharyngiennes pour filtrer de façon similaire à celle des céphalochordés. Ajoutés aux données qui appuient l'hypothèse selon laquelle l'ancêtre commun des deutérostomes était un organisme mobile vermiforme qui possédait des fentes pharyngiennes, les résultats de notre étude suggèrent que la filtration pharyngienne est probablement un caractère ancestral aux deutérostomes.

CHAPITRE 2

Localisation du facteur de transcription *Pit-1* chez
l'entéropneuste *Saccoglossus pusillus* :
implications sur l'homologie de l'organe pré-oral
cilié des entéropneustes et de l'adénohypophyse
des vertébrés

INTRODUCTION

1. L'organe pré-oral cilié des entéropeustes

L'organe pré-oral cilié (POCO) des entéropeustes est une structure épithéliale ciliée en forme de U située sur la face postérieure du proboscis, antérieurement à la bouche et entourant le pédoncule du proboscis (Fig. 11A). Le POCO est présent chez la majorité des espèces d'entéropeustes (Brambell & Cole, 1939). Nous avons déterminé que chez l'entéropeuste *Protoglossus graveolens*, les longs cils positionnés en périphérie du POCO servent à créer un courant inhalant à l'entrée de la bouche (Gonzalez & Cameron, 2009; chapitre 1). Sa fonction chez les entéropeustes non filtreurs reste obscure. La région du POCO diffère histologiquement du reste de la surface du proboscis, par la rareté de certains types de cellules glandulaires ("mulberry cells" et "goblet cells"), et par l'abondance de cellules possiblement sensorielles, qui envoient des axones vers le plexus nerveux basiépithélial, plus épais dans la région du POCO que dans le reste du proboscis (Brambell & Cole, 1939; Bullock & Horridge, 1965). Par conséquent, le POCO pourrait être un organe chémo-récepteur (Knight-Jones, 1953; Bullock & Horridge, 1965; Welsch & Welsch, 1978). Le POCO est considéré comme un homologue potentiel du wheel organ des céphalochordés et de l'adénohypophyse des vertébrés (Brambell & Cole, 1939; Welsch & Welsch, 1978).

2. Homologie du POCO et du wheel organ des céphalochordés

Plusieurs similarités entre le POCO des entéropeustes et le wheel organ des céphalochordés suggèrent leur homologie. Tout comme le POCO, le wheel organ (Fig. 11B) est une structure épithéliale ciliée située antérieurement à la bouche, à la surface

du plafond et des côtés de la cavité buccale. Ces deux structures sont d'origine ectodermique et composées de cellules cylindriques (Sahlin & Olsson, 1986; Gonzalez & Cameron, 2009). La fonction de ces deux structures est la création d'un courant inhalant à l'entrée de la bouche (Orton, 1913; Gonzalez & Cameron, 2009). En dehors de ces similarités morphologiques et fonctionnelles, la question de l'homologie de ces deux structures n'a pas fait l'objet d'études plus approfondies.

3. Homologie du wheel organ des céphalochordés et de l'adénohypophyse des vertébrés

Dorsalement, le wheel organ des céphalochordés contient une population de cellules épithéliales spécialisée appelée la fosse de Hatschek. La fosse de Hatschek est homologue à l'adénohypophyse des vertébrés.

L'adénohypophyse fait partie du système neuroendocrine des vertébrés, et est constitué des lobes antérieur et intermédiaire de l'hypophyse. Le développement de l'adénohypophyse débute par une invagination de l'ectoderme oral, qui forme la poche de Rathke (Kardong, 2002; Scully & Rosenfeld, 2002). Au cours du développement, la poche de Rathke se sépare de l'ectoderme et vient s'accoler à l'infundibulum, une invagination du diencéphale. La poche de Rathke devient l'adénohypophyse, et l'infundibulum devient la neurohypophyse (Kardong, 2002). La neurohypophyse reste reliée à l'hypothalamus par la tige pituitaire, et l'hypothalamus régule l'activité endocrine de l'adénohypophyse par l'intermédiaire de neurohormones (Kardong, 2002; Scully & Rosenfeld, 2002). L'adénohypophyse est composée principalement de cinq types de cellules: corticotropes, thyrotropes, somatotropes, lactotropes et gonadotropes, qui sécrètent respectivement les hormones ACTH (hormone corticotrope), TSH (hormone thyroïdienne), GH (hormone de croissance), prolactine, et les gonadotropines LH et FSH (hormone lutéinisante et folliculostimuline) (Burrows *et al.*, 1999). Ces hormones régulent des processus importants

telles que la croissance et la reproduction.

La fosse de Hatschek est considérée comme homologue à l'adénohypophyse des vertébrés pour plusieurs raisons. Tout d'abord, ces deux structures sont dérivées de l'ectoderme stomodéal. Deuxièmement, la présence de granules et de vésicules situées basalement dans les cellules du wheel organ et de la fosse de Hatschek, accolées à des espaces sanguins, suggère une fonction endocrine (Tjoa & Welsch, 1974; Welsch & Welsch, 1978; Sahlin & Olsson, 1986). Troisièmement, les cellules de la fosse de Hatschek sont immunoréactives à plusieurs hormones sécrétées chez les vertébrés par l'adénohypophyse: LH (Chang *et al.*, 1982; Nozaki & Gorbman, 1992), FSH (Zhang *et al.*, 1984), GTH (gonadotropine de poisson) (Fang, 1993) et GH (hormone de croissance) (Fang & Weng, 2006). Troisièmement, l'injection d'homogénats de fosse de Hatschek est capable de stimuler l'activité des gonades chez les céphalochordés, mais aussi chez la grenouille (Fang & Wang, 1984), alors que l'endommagement de la fosse de Hatschek affecte négativement l'activité des gonades (Fang *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent que des cellules de la fosse de Hatschek sont capables de réguler la reproduction saisonnière par la production de gonadotropines, probablement en réponse à la présence de phéromones dans l'environnement (Gorbman, 1995). Enfin, il existe chez les céphalochordés une extension de la vésicule cérébrale qui contourne la notochorde pour s'accoler précisément au niveau de la fosse de Hatschek (Gorbman *et al.*, 1999). Cette structure est similaire à l'infundibulum des vertébrés, qui est lui aussi une extension du système nerveux central, et qui s'accole au cours du développement à l'adénohypophyse.

Des données concernant l'expression chez les céphalochordés des gènes régulateurs du développement de l'adénohypophyse des vertébrés suggèrent également l'homologie de la fosse de Hatschek et de l'adénohypophyse. Au cours du développement, les facteurs de transcription *Eya*, *Islet*, *Lhx*, *Pit-x*, *Six1/2* et *Six3/6*, cruciaux pour le développement de l'adénohypophyse des vertébrés, sont exprimés dans l'organe préoral des larves de céphalochordés, qui devient par la suite la fosse de Hatschek (Candiani *et al.*, 2008). Chez

les vertébrés, le facteur de transcription *Pit-1* est exprimé exclusivement au niveau de l'adénohypophyse, au cours du développement comme chez l'adulte, et est responsable de la différenciation terminale de trois des cinq types cellulaires qui la composent: thyrotropes, somatotropes et lactotropes (Rosenfeld, 1991; Nica *et al.*, 2004). Chez le céphalochordé adulte *Branchiostoma lanceolatum*, la présence de cellules immunoréactives à *Pit-1* a été détectée dans la fosse de Hatschek par immunohistochimie (Candiani & Pestarino, 1998). De plus, un homologue du gène *Pit-1* (AmphiPOU1F1/*Pit-1*) est exprimé chez la larve d'amphioxus exclusivement au niveau de l'organe préoral (Candiani *et al.*, 2008).

4. Homologie morphologique et données moléculaires

Au cours du développement, l'identité et la position relative de chaque type cellulaire au sein de l'organisme sont déterminées par l'expression différentielle dans le temps et l'espace de gènes ou réseaux de gènes dits « régulateurs ». La plupart de ces gènes codent pour des facteurs de transcription et des molécules de signalisation cellulaire (Davidson & Erwin, 2006). Au cours de l'évolution, les patrons d'expression développementaux de ces gènes ou réseaux génétiques sont généralement conservés au niveau de structures homologues. Par exemple, un même patron d'expression des gènes de la famille *HoxD* gouverne le développement des autopodes (poignet/cheville et doigts) de tous les tétrapodes (Shubin *et al.*, 2009).

Cependant, un gène ou la totalité d'un réseau régulateur génétique peut être co-opté au cours de l'évolution pour réguler le développement de structures non homologues. Par exemple, les gènes responsables d'organiser le système nerveux central des arthropodes le long de leur axe antéro-postérieur (notamment les gènes de la famille *Hox*) sont exprimés eux aussi dans le système nerveux central des chordés en développement, en un patron spatio-temporel similaire (Aronowicz & Lowe, 2006). Néanmoins, le système nerveux central ventral des arthropodes n'est pas nécessairement homologue au tube neural dorsal

des chordés (Aronowicz & Lowe, 2006). De plus, la plupart des gènes régulateurs sont pleïotropiques : ils sont généralement impliqués chez un même organisme dans le développement de plusieurs structures non homologues (Carroll, 2008).

Il n'y a donc pas de corrélation directe entre homologie morphologique et similarités dans les patrons d'expression de gènes régulateurs. Toutefois, il est toujours pertinent d'analyser les patrons d'expression de ces gènes lorsque l'on s'intéresse à l'homologie potentielle de deux structures. Si deux structures sont morphologiquement similaires, alors que leur développement est régulé par l'expression de gènes différents, l'homologie de ces deux structures sera remise en question. À l'inverse, même si des différences morphologiques peuvent obscurcir l'homologie de deux structures, l'analyse des patrons d'expression des gènes qui gouvernent leur développement pourra révéler une possible homologie.

5. Le facteur de transcription *Pit-1* est-il exprimé dans l'organe pré-oral cilié chez l'entéropneuste adulte *Saccoglossus pusillus*?

L'hypothèse selon laquelle l'organe pré-oral cilié des entéropneustes est homologue à la fosse de Hatschek des céphalochordés et à l'adénohypophyse des vertébrés repose sur un nombre limité de similarités morphologiques. Afin d'approfondir cette hypothèse, il est nécessaire de déterminer chez un entéropneuste les patrons d'expression des facteurs de transcription qui sont impliqués dans le développement de l'adénohypophyse des vertébrés. Parmi ces facteurs de transcription, nous avons choisi de nous intéresser à *Pit-1* pour deux raisons. Premièrement, ce facteur de transcription est exprimé uniquement dans l'adénohypophyse chez les vertébrés et dans la fosse de Hatschek chez les céphalochordés (pas de pléïotropie). Deuxièmement, *Pit-1* reste exprimé au stade adulte chez les vertébrés comme chez les céphalochordés. N'ayant accès qu'à des entéropneustes adultes, nous avons conduit notre étude en se basant sur la prémisse que ce facteur de transcription, s'il

montrait un patron d'expression similaire à celui des chordés, serait également exprimé chez les entéropeustes au stade adulte.

Notre étude vise donc à déterminer l'expression du facteur de transcription *Pit-1* chez l'entéropeuste adulte *Saccoglossus pusillus*, par immunohistochimie.

ARTICLE

Immunohistochemical localisation of the pituitary-specific transcription factor *Pit-1* in the adult enteropneust hemichordate *Saccoglossus pusillus*

PAUL GONZALEZ, CHRISTOPHER B. CAMERON, GUILLAUME DESROCHERS

Article en cours de préparation.

Abstract

The enteropneust pre-oral ciliary organ (POCO) is a U-shaped ciliated structure situated anterior to the mouth. Its function is to drive an inhalant flow to the mouth in filter-feeding species. It may also have a sensory function. Structural similarities with the cephalochordate wheel organ suggest their homology. The POCO, like Hatschek's pit in cephalochordates, may also be homologous to the vertebrate adenohypophysis. To test this hypothesis, the expression of the pituitary-specific transcription factor *Pit-1* in the adult enteropneust *Saccoglossus pusillus* is determined using immunohistochemistry. *Pit-1* immunoreactive cells are localized in sensory cells of the POCO and in scattered epithelial cells of the proboscis, collar and trunk, and in the pharyngeal endoderm. The diffuse expression pattern of *Pit-1* in *Saccoglossus* does not allow to confirm or reject its homology with the vertebrate adenohypophysis. Concerns about the non-specificity of the antibody used make further studies necessary.

Introduction

The pre-oral ciliary organ (POCO) of enteropneusts is a U-shaped structure situated on the postero-ventral end of the proboscis, just anterior to the proboscis stalk and mouth. In the filter-feeding enteropneust *Protoglossus graveolens*, the POCO is delimited by a continuous ridge covered by a dense boundary of long cilia, encircling a ciliated field of shorter cilia, and it creates a feeding current at the entrance to the mouth and pharynx (Gonzalez & Cameron, 2009). The whole posterior surface of the proboscis, including the region of the POCO, differs histologically from the rest of the proboscis epidermis, by the scarcity of the glandular mulberry and goblet cells and by the presence of presumably sensory cells, which send axons to the basiepidermal nerve layer, considerably thicker in this region than in the rest of the proboscis (Brambell & Cole, 1939). It may thus be a chemoreceptive organ (Knight-Jones, 1953; Welsch & Welsch, 1978). Since its first description (Brambell & Cole, 1939), the POCO has been viewed as a potential homologue

of the wheel organ of cephalochordates and of the vertebrate adenohypophysis (Brambell & Cole, 1939; Welsch & Welsch, 1978), but this hypothesis was never thoroughly tested.

Like the POCO, the cephalochordate wheel organ is a ciliated epithelial structure located anterior to the mouth, in the roof and sides of the oral cavity. Its function is to drive a current of water into the mouth (Orton, 1913). Dorsally, it contains a region of specialized epithelial cells called Hatschek's pit. Hatschek's pit may be homologous to the vertebrate adenohypophysis, the anterior pituitary region that regulates stress, growth and reproduction. The presence of basally located granules and vesicles in some of the cells of the wheel organ and Hatschek's pit, occurring near underlying blood spaces, suggests an endocrine function (Tjoa & Welsch, 1974; Welsch & Welsch, 1978; Sahlin & Olsson, 1986). Granules in cells of Hatschek's pit are immunoreactive to a number of hormones secreted in vertebrates by the adenohypophysis: LH (Chang *et al.*, 1982; Nozaki & Gorbman, 1992), FSH (follicle stimulating hormone) (Zhang *et al.*, 1984), GTH (fish gonadotropin) (Fang, 1993), and GH (growth hormone) (Fang & Weng, 2006). Moreover, injection of Hatschek's pit homogenates in amphioxus and juvenile toads stimulates gonadal activity (Fang & Wang, 1984), whereas damaging Hatschek's pit negatively affects gonadal development (Fang *et al.*, 2001). It was thus proposed that cells in Hatschek's pit could regulate seasonal reproduction by the release of gonadotropins in response to pheromonal cues in the environment (Gorbman, 1995). The presence of an extension of the cerebral vesicle encircling the notochord to contact Hatschek's pit, similar to the vertebrate infundibulum, suggests that the release of gonadotropins or other hormones could possibly be regulated in a similar way as in the hypothalamo-hypophyseal system of vertebrates (Gorbman *et al.*, 1999).

Key genes regulating the development of the vertebrate adenohypophysis are expressed in the preoral organ of amphioxus (which gives rise to Hatschek's pit) during larval development, including *Eya*, *Islet*, *Lhx*, *Pit-x*, *Six1/2* and *Six3/6* (reviewed in Candiani *et al.*, 2008). One of these key transcription factors, *Pit-1*, is expressed in

vertebrates exclusively in the adenohypophysis, where it is required for the terminal differentiation of three of its five endocrine cell types: thyrotropes, somatotropes and lactotropes (Rosenfeld, 1991; Nica *et al.*, 2004). In the adult cephalochordate *Branchiostoma lanceolatum*, *Pit-1*-like immunoreactivity has been detected in Hatschek's pit (Candiani & Pestarino, 1998), and the amphioxus *Pit-1* homologue (*AmphiPOU1F1/Pit-1*) is expressed during larval development exclusively in the larval preoral organ (Candiani *et al.*, 2008). Recent phylogenetic studies place Cephalochordata as basal chordates, and Ambulacraria as sister-group to chordates (Delsuc *et al.*, 2008; Putnam *et al.*, 2008). Comparative studies between cephalochordates and enteropneusts may thus provide insights into the early evolution of the adenohypophysis. Here, we investigate the potential presence of *Pit-1* in the enteropneust pre-oral ciliary organ, a putative homologue of the wheel organ of cephalochordates and of the vertebrate adenohypophysis. This study aims to demonstrate the presence of *Pit-1* and its localization in the adult enteropneust *Saccoglossus pusillus* by means of immunohistochemistry.

Materials and Methods

Animal collection

Saccoglossus pusillus were collected at low tide at Cape Beale, near Bamfield, B.C., and transported to the Bamfield Marine Sciences Centre, B.C, where they were kept in their natural sediments in an aquarium under a flow of ambient seawater.

Immunohistochemistry

After anesthesia in 7% MgCl₂, specimens were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS at pH7.4 for 24h. For paraffin sectioning, specimens were dehydrated through a graded series of ethanol, transferred to xylene and embedded in polyester wax. 10 µm and 20 µm sections were cut on a microtome and mounted on slides

coated with poly-L-lysine. Slides were then deparaffinized with xylene and rehydrated. Tissues were treated with a blocking solution (2.5% BSA, 0.1% Triton X-100 in PBS) for 1 hour and incubated overnight at 6°C with the primary *Pit-1* rabbit polyclonal antibody (Abcam ab24756) diluted 1:1000 in blocking buffer. After washing 3 times in PBS for 10 minutes, tissues were treated with the secondary ALEXA 594-conjugated goat anti-rabbit IgG for 5 hours at 6°C. Slides were then washed again and mounted in PBS. Controls were run by omitting the primary or secondary antibody.

SDS –PAGE and Western Blot

Western Blot analysis was used to test the specificity of the antibody used for immunohistochemistry. Worms were left in a clean bowl of seawater until their gut was empty. They were then frozen with liquid nitrogen. Tissue was homogenised in a solution of 20 mM HEPES at pH 7.4, 150mM NaCl and protease inhibitors, and centrifuged at 1000g for 10 minutes. Triton X-100 was added at a final concentration of 1% and homogenates were incubated at 4°C for 30 minutes with agitation. Homogenates were then centrifuged at 45000 rpm for 30 minutes, and the supernatant fraction collected. Total protein concentration was determined using the Bradford method. 100 µg extracts were separated by SDS-PAGE. Proteins were then transferred on a nitrocellulose membrane for Western blotting. Membranes were treated with a blocking *blotto* solution (5% skimmed milk, 0.05% Tween-20 in PBS) for 1h before incubation with the primary *Pit-1* rabbit polyclonal antibody (Abcam ab24756) diluted 1:1000 in *blotto* solution for 12h. After washing 3 times in *blotto* for 10 minutes, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Jackson Immunoresearch Labs, West Grove, USA) diluted 1 :1000 in *blotto*. Membranes were washed in *blotto* before revelation on radiographic film.

Results

Pit-1 immunoreactivity was observed in epithelial cells of the pre-oral ciliary organ (Fig. 12A, B). In horizontal sections through the posterior proboscis, *Pit-1* expression was seen as conspicuous paired groups of immunoreactive cells on each side of the proboscis stalk (Fig. 12A) or as a continuous band of cells on the posterior proboscis (Fig. 12B), corresponding to the position of the POCO. *Pit-1* immunoreactive cells in the POCO are elongated, and project into the basiepithelial nerve plexus underlying the POCO (Fig. 13). *Pit-1* immunoreactivity was also observed in epithelial cells scattered throughout the epidermis of the proboscis (Fig. 12C), trunk, (Fig. 12D), collar (Fig. 12E), and throughout the endoderm of the collar (Fig. 12F) and pharynx (Fig. 12G). In these cells, immunoreactivity is limited to apically located vesicles. No immunoreactivity was detected in controls.

Western Blot analysis identified a single band corresponding to a molecular weight of 63 KDa (Fig. 14).

Discussion

In vertebrates and cephalochordates, *Pit-1* expression is restricted to spatially localized populations of cells, in the adenohipophysis and preoral organ/Hatschek's pit respectively. In the adult *Saccoglossus*, *Pit-1* immunoreactive cells are grouped in the POCO, but are also scattered throughout the whole epidermis, and in the endoderm of the collar and pharynx. Thus, the presence of *Pit-1* in the POCO does not provide a definitive answer to the question of its homology with the wheel organ and/or Hatschek's pit of cephalochordates and the adenohipophysis of vertebrates.

In the POCO and the posterior face of the proboscis, *Pit-1* immunoreactive cells resemble typical chemosensory cells, bipolar sensory neurons which extend a neurite

terminated into a cilium to the environmental interface and project an axon to the nervous system (Krieger & Breer, 1999). Morphologically similar cells are present throughout the entire epidermis of enteropneusts (Hyman, 1959), but their higher concentration in the POCO, and their connexion with a thickening of the nerve plexus in this region, had led previous authors to homologize it with the vertebrate adenohypophysis (Welsch & Welsch, 1978). The fact that these cells also express *Pit-1*, and that this population of cells appears to be the most dense agglomeration of *Pit-1* immunoreactive cells in the body of *Saccoglossus* strengthens this hypothesis. The vertebrate adenohypophysis may have evolved from an invertebrate olfactory organ, possessing both a chemoreceptive and endocrine function, used in synchronizing reproduction with environmental or pheromonal cues (Gorbman, 1995). Enteropneust reproduction is seasonal, and may be triggered in part by the release of GnRH in the environment, acting as a pheromone (Gorbman *et al.*, 2003). However, the putative sensory and/or endocrine function of the POCO remains to be demonstrated. To date there is no evidence for the presence of gonadotropin hormones in hemichordates that could establish further similarities between the control of reproduction in hemichordates and its regulation by the hypothalamo-hypophyseal system in vertebrates.

The diffuse pattern of *Pit-1* expression in *Saccoglossus* is similar to the distribution of GnRH in the mulberry cells of *Saccoglossus*, which are also scattered throughout the entire epidermis, and in the pharynx endoderm (Cameron *et al.*, 1999). These expression patterns may reflect a general tendency for scattered epithelial cells in enteropneusts to assume functions that are restricted to centralized neurosecretory or endocrine organs in chordates.

Our Western Blot analysis identified a single band corresponding to a molecular weight of 63 KDa. In cephalochordates and vertebrates, the molecular weight of *Pit-1* is 33 KDa (Candiani & Pestarino, 1988). This difference may be due to a lack of specificity of our antibody and raises concerns about the validity of our results. Further studies using different antibodies or techniques less prone to non-specific labeling, as well as early

developmental studies, are required to determine the expression pattern of *Pit-1* in the Enteropneusta.

Acknowledgments

The director and staff of the Bamfield Marine Sciences Centre are gratefully acknowledged for their assistance during our stay at the facility.

CONCLUSIONS

Chez les vertébrés et les céphalochordés, l'expression de *Pit-1* est restreinte à des populations de cellules localisées respectivement dans l'adénohypophyse et la fosse de Hatschek. Chez l'adulte *Saccoglossus pusillus*, les cellules immunoréactives à *Pit-1* sont regroupées dans le POCO, mais sont également dispersées dans l'épiderme général et dans l'endoderme du collet et du pharynx. Ce patron d'expression, non localisé dans la région du POCO, ne permet donc pas de confirmer ou de rejeter l'hypothèse de son homologie avec le wheel organ et/ou la fosse de Hatschek des céphalochordés et l'adénohypophyse des vertébrés.

Au niveau du POCO et sur la face postérieure du proboscis, la morphologie des cellules immunoréactives pourrait indiquer une fonction sensorielle. Ces cellules projettent un cil à l'interface de l'environnement extérieur, et envoient un axone vers le plexus nerveux basiépithélial. Des cellules morphologiquement similaires sont présentes dans l'épiderme général des entéropeustes (Hyman, 1959), mais leur concentration dans le POCO et leur connexion avec un épaissement du plexus nerveux dans cette région avait conduit à l'hypothèse que le POCO avait une fonction sensorielle (Brambell & Cole, 1939; Bullock & Horridge, 1965) et était possiblement homologue à l'adénohypophyse (Welsch & Welsch, 1978). Le fait que ces cellules expriment également *Pit-1*, et que cette population de cellules représente l'agglomération la plus dense de cellules immunoréactives à *Pit-1* chez *Saccoglossus* renforce cette hypothèse.

L'adénohypophyse pourrait avoir évolué à partir d'un organe olfactif d'invertébré, ayant une fonction à la fois chémoréceptrice et endocrine, capable de synchroniser la reproduction avec des stimuli environnementaux ou avec la présence de phéromones (Gorbman, 1995). La reproduction chez les entéropeustes est saisonnière, et pourrait être déclenchée en partie par la présence de GnRH (qui chez les vertébrés régule la production

des gonadotropines) dans l'environnement, qui agirait comme une phéromone (Gorbman *et al.*, 2003). Toutefois, une fonction sensorielle et/ou endocrine assumée par le POCO reste à démontrer. Il n'existe actuellement aucune donnée suggérant la présence de gonadotropines chez les hémichordés, qui pourrait établir de plus grandes similarités entre le contrôle de la reproduction chez les hémichordés et sa régulation par le système hypothalamo-hypophysaire des vertébrés.

Le patron d'expression diffus de *Pit-1* chez *Saccoglossus* est similaire à la distribution des cellules immunoréactives à GnRH dans les « mulberry cells » de *Saccoglossus*, qui sont également distribuées dans tout l'épiderme, ainsi que dans l'endoderme du pharynx (Cameron *et al.*, 1999). Ces patrons d'expression pourraient refléter une tendance générale pour des cellules épithéliales dispersées dans l'épiderme et l'endoderme des entéropeustes à assumer des fonctions restreintes chez les chordés à des structures neurosécrétrices ou endocrines centralisées.

La portée de cette étude est limitée par des doutes au sujet de la spécificité de l'anti-corps utilisé. Les résultats obtenus par Western Blot ont identifié une bande unique correspondant à un poids moléculaire de 63 KDa. Chez les céphalochordés et les vertébrés, le poids moléculaire de *Pit-1* est de 33 KDa (Candiani & Pestarino, 1998). Cette différence pourrait signifier que le marquage décrit ici est non spécifique à *Pit-1*, et ainsi invalider nos résultats. Afin de vérifier cette hypothèse, il est nécessaire de conduire des contrôles en pré-absorbant l'anti-corps utilisé avec *Pit-1* avant d'effectuer le marquage, ainsi que d'étendre cette étude par l'utilisation de techniques de marquage plus spécifiques comme l'hybridation *in-situ*. Cette étude est également limitée par l'absence de données concernant l'expression temporelle de *Pit-1* au cours du développement.

CHAPITRE 3

L'ultrastructure du coenecium de
Cephalodiscus et l'évolution du coenecium des
ptérobranches

INTRODUCTION

La classe Pterobranchia regroupe les genres *Rhabdopleura*, *Cephalodiscus* et *Atubaria*. Les ptérobranches sont des organismes coloniaux de petite taille (moins de 1 mm pour *Rhabdopleura* et entre 1 et 5 mm pour *Cephalodiscus*), dont les zooïdes vivent en commun (parfois plusieurs centaines d'individus) dans une structure tubulaire collagèneuse appelée coenecium (Ruppert *et al.*, 2004), qu'ils sécrètent à l'aide de leur bouclier céphalique (Dilly, 1986). Le genre *Atubaria* ne comprend qu'une seule espèce, *Atubaria heterolopha*, qui ne sécrèterait pas de coenecium (Komai, 1949). Les genres *Rhabdopleura* et *Cephalodiscus* comprennent respectivement 4 et 18 espèces actuelles. À l'intérieur de chaque genre, les zooïdes montrent peu de disparité morphologique (Hyman, 1959). Leur taxonomie est donc basée sur la morphologie de leur coenecium (Markham, 1971).

1. Structure du coenecium des ptérobranches

1.1 Organisation du coenecium de *Rhabdopleura*

L'astogénie (le « développement » du coenecium au cours du temps) de *Rhabdopleura* a été décrite par Dilly (1985a) et Stebbing (1970). Lorsqu'une larve de *Rhabdopleura* se fixe sur un substrat approprié (coquille de bivalve, pierre coralline), elle sécrète une structure sphérique appelée dôme larvaire (Fig. 15A), dans laquelle elle reste enfermée jusqu'à sa métamorphose en zooïde adulte, appelé zooïde primaire (ou terminal) de la colonie. Ce zooïde perce alors le dôme et débute la sécrétion d'un « tube rampant », une structure tubulaire horizontale fixée au substrat sur toute sa longueur (Fig. 15A, B). Le tube rampant est formé d'unités semi-annulaires, les fuselli. La jonction entre chaque fusellus crée une suture en zig-zag le long du tube rampant (Fig. 15C). Le pédoncule

contractile du zooïde primaire s'étend en un stolon. Ce stolon est initialement nu (gymnocaulus) puis devient entouré d'une gaine de tissu sclérifié (pectocaulus ou stolon noir) (Urbanek & Dilly, 2000). Le lumen du stolon contient des vaisseaux sanguins et possiblement des fibres nerveuses (Dilly, 1975). Avant de devenir sclérifié, le stolon se ramifie à intervalle régulier, et un zooïde produit par bourgeonnement (blastozooïde) se développe à l'extrémité de chaque nouvelle branche du stolon. Le pédoncule contractile des blastozooïdes reste attaché de façon permanente au stolon de la colonie. Chaque blastozooïde sécrète un septum à l'intérieur du tube rampant, qui l'isole du reste de la colonie, puis perfore le tube rampant et débute la sécrétion d'un tube vertical, appelé tube droit (Fig. 15A, B). À la jonction entre tube rampant et tube droit, un élargissement de la partie sclérifiée du stolon, appelé diaphragme, marque la séparation entre le stolon et le pédoncule contractile du blastozooïde (Urbanek & Dilly, 2000). Les fuselli qui composent le tube droit sont des anneaux complets, et l'endroit qui correspond au début et la fin de la sécrétion de chaque fusellus est marqué par la présence d'une suture oblique (Fig. 15D). Au fur et à mesure que le stolon grandit, de nouveaux blastozooïdes se développent, et de nouveaux tubes droits sont ajoutés le long du tube rampant. La taille totale d'un coenecium de *Rhabdopleura* varie entre 1 et 25 cm de diamètre et entre 5 et 10 mm de hauteur (Ruppert *et al.*, 2004).

1.2. Organisation du coenecium de *Cephalodiscus*

Alors que la morphologie du coenecium de *Rhabdopleura* est basée sur un modèle invariable (succession de tubes droits ajoutés de façon linéaire le long d'un tube rampant), le coenecium de *Cephalodiscus* montre une plus grande disparité interspécifique (Fig. 16). Les cavités du coenecium peuvent être cylindriques, irrégulières ou absentes, et les zooïdes sont capables de sécréter des extensions en forme d'épines ou de lèvres obliques sur lesquelles ils se perchent pour s'élever dans la colonne d'eau et s'alimenter (Markham, 1971). Contrairement à *Rhabdopleura*, les tubes et les cavités tubulaires ne sont pas

composés d'éléments annulaires ou semi-annulaires, et les lignes de croissance, bien que visibles, sont irrégulières et difficiles à interpréter (Urbanek, 1976). Chez *Cephalodiscus*, les zooïdes ne restent pas attachés aux autres membres de la colonie de façon permanente. Le stolon est absent et les zooïdes sont produits par bourgeonnement à l'extrémité du pédoncule contractile de l'individu parent, parfois modifié en un disque adhésif cilié (Fig. 1C) (Lester, 1985). Lorsqu'ils ont complété leur développement, ils se détachent et peuvent se déplacer librement dans la colonie. Le genre *Cephalodiscus* est divisé en quatre sous-genres correspondant à différents types d'organisation du coenecium (Ridewood, 1920; Markham, 1971). Le coenecium des membres du sous-genre *Orthoecus* (Fig. 16A) (Andersson, 1907; Ridewood 1918a, 1918b; John, 1931) est composé de tubes droits indépendants les uns des autres, mais soudés entre eux extérieurement par une substance coeneciale commune. Chaque tube droit est composé de bandes de croissance de forme irrégulière. Chaque tube est habité par un zooïde et ses bourgeons. Lorsqu'un bourgeon arrive à maturité, il se détache de l'individu parental et migre à la périphérie de la colonie, où il sécrète son propre tube (Ridewood, 1918a). Dans le sous-genre *Idiothecia* (Fig. 16B) (Harmer, 1905; Lankester, 1905; Ridewood, 1906, 1907, 1918a, 1918b; Harmer & Ridewood, 1913), les zooïdes vivent également dans des tubes individuels, mais ces tubes sont organisés en une structure ramifiée. La croissance du coenecium est apicale : les zooïdes récemment détachés migrent vers l'apex de la colonie où ils débutent la construction d'un nouveau tube. Des couches de substance coeneciale sont ensuite sécrétées autour des nouveaux tubes. Le sous-genre *Cephalodiscus* (Harmer, 1905; Andersson, 1907; Ridewood, 1907; Johnston & Muirhead, 1951; Bayer, 1962; Emig, 1977), est défini par l'absence de tubes individuels. Les zooïdes peuvent se déplacer librement à l'intérieur d'une cavité commune qui s'ouvre sur l'extérieur par des ostia placés le long ou à l'extrémité de la structure ramifiée du coenecium. Les épines sont communes dans ce sous-genre (Fig. 16C). Les épines sont généralement présentes sur toute la surface du coenecium, mais sont souvent placées autour des ostia. Le sous-genre *Acoelothecia* comprend une seule espèce, *C. kempi*, dont le coenecium ne possède pas de cavité tubulaire, et est uniquement composé d'un réseau d'épines soudées les unes aux autres (John, 1931). Malgré quelques

observations chez *C. gracilis* (Dilly, 1985b; Dilly, 1986; Dilly, 1988) et *C. graptolitoides* (Dilly, 1993), les mécanismes de sécrétion du coenecium de *Cephalodiscus* sont méconnus.

2. Homologie du coenecium des ptérobranches et du rhabdosome des graptolithes

Les ptérobranches sont apparentés aux graptolithes. Les graptolithes (classe Graptolithina), sont un groupe éteint d'organismes coloniaux benthiques (les ordres sessiles Crustoidea, Tuboidea, Camaroidea, Dendroidea) et pélagiques (Graptoloidea), connus uniquement par les fossiles de leur rhabdosome, une structure similaire au coenecium des ptérobranches (Fig. 17). Les graptolithes sont apparus au Cambrien moyen et ont disparu au cours du Carbonifère (Rickards & Durman, 2006). Leur parenté avec les ptérobranches a été démontrée par l'analyse comparative de l'organisation, de la composition et de l'ultrastructure de leur rhabdosome avec le coenecium des ptérobranches.

2.1. Similarités structurales et composition

Le coenecium des ptérobranches, ainsi que le rhabdosome des graptolithes, est composé principalement de collagène (Towe & Urbanek, 1972; Armstrong *et al.*, 1984). Les similarités entre le rhabdosome des graptolithes et le coenecium de *Rhabdopleura* incluent également la présence de lignes de croissance annulaires, les fuselli (Kozłowski, 1938, 1947, 1949, 1966, 1971), dont la forme et l'arrangement sont uniques à ces deux groupes (Kozłowski, 1966), ainsi que la présence d'un réseau de tubes connecté par un stolon sclérifié, associé à des diaphragmes (Urbanek & Dilly, 2000), un patron de bourgeonnement commun à partir d'un zooïde primaire (Kozłowski, 1949), la présence d'un dôme larvaire (appelé prosicula chez les graptolithes) (Kozłowski, 1971; Stebbing, 1970; Dilly, 1985a), la présence de sutures en zig-zag régulières, et la présence de

structures de dormance similaires (Urbanek & Dilly, 2000). Le partage de ces caractères entre *Rhabdopleura* et les graptolithes, et leur absence chez *Cephalodiscus*, indique une plus grande parenté entre *Rhabdopleura* et Graptolithina.

2.2. Ultrastructure du rhabdosome des graptolithes

Les études visant à déterminer l'ultrastructure du coenecium des ptérobranches et du rhabdosome des graptolithes, c'est à dire la structure et l'arrangement des fibrilles de collagène qui le composent, ont joué un rôle prépondérant dans le débat concernant la parenté de ces deux groupes (Urbanek, 1986). La terminologie utilisée pour décrire le rhabdosome des graptolithes fait la distinction entre les dépositions primaires (les fuselli annulaires), et les dépositions secondaires, sécrétées subséquentement et recouvrant les fuselli. Ces deux « tissus » possèdent une ultrastructure différente. Le tissu fusellaire est composé principalement de fibrilles fusellaires. Ces fibrilles sont ondulées, ramifiées et forment des anastomoses qui créent un réseau tri-dimensionnel d'apparence spongieuse (Urbanek & Towe, 1974). Leur diamètre varie entre 60 et 110 nm (Mierzejewski & Kulicki, 2003). Les dépositions secondaires sont sécrétées par-dessus les fuselli sous forme de bandages. La taille et la forme de ces bandages suggère qu'ils sont sécrétés par une structure comparable au bouclier céphalique des ptérobranches actuels (Crowther, 1978). Plusieurs types de dépositions secondaires existent. Le vrai cortex (eucortex) est composé principalement de groupes de fibrilles corticales parallèles séparées par des feuillets (Fig.18) (Urbanek & Mierzejewski, 1984). Les feuillets, aussi appelés membranes, apparaissent au microscope électronique à transmission comme des lignes électron-denses. Les fibrilles corticales sont droites et plus épaisses que les fibrilles fusellaires (100 nm - 1 µm) (Mierzejewski & Kulicki, 2003). L'orientation des fibrilles est parallèle à l'intérieur d'un même bandage cortical, mais varie entre bandages adjacents (Fig. 18). Les dépositions secondaires peuvent également prendre la forme d'une accumulation de feuillets séparés

par un matériau composé de fibrilles non corticales (paracortex) (Fig. 18) ou totalement dépourvu de fibrilles (pseudocortex) (Fig. 18) (Urbanek & Mierzejewski, 1984).

2.3 L'ultrastructure du coenecium des ptérobranches

Des études utilisant le microscope électronique à transmission (MET) ont montré que les fuselli de *Rhabdopleura* (Dilly, 1971) et le coenecium de *Cephalodiscus* (Urbanek, 1976; Andres, 1980; données non publiées mentionnées dans Urbanek & Mierzejewski, 1984) étaient composés d'un même type de fibrilles : longues, droites, très fines (*Rhabdopleura*: 4-30 nm, *Cephalodiscus*: 19-22 nm), et orientées de façon aléatoire. Ce type de fibrilles est absent chez les graptolithes. La présence de ce type de fibrilles dans les fuselli de *Rhabdopleura* et dans les bandes de croissance irrégulières de *Cephalodiscus* a servi à appuyer l'homologie de ces deux structures (Urbanek, 1976). De plus, cette similarité ultrastructurale entre les ptérobranches actuels, non partagée par les graptolithes éteints, a appuyé l'hypothèse selon laquelle les ptérobranches actuels forment un groupe monophylétique à l'exclusion des graptolithes éteints (Urbanek, 1976). Récemment, cette hypothèse a été abandonnée suite à des études utilisant la microscopie électronique à balayage (MEB), qui ont démontré l'existence de fibrilles fusellaires et corticales similaires à celles des graptolithes chez des rhabdopleurides fossiles (Mierzejewski & Kulicki, 2001) ainsi que chez deux espèces de *Rhabdopleura* actuelles (Mierzejewski & Kulicki, 2003). Deux types de dépôts secondaires ont également été trouvés à l'intérieur des tubes chez *Rhabdopleura* : des dépôts membranaires similaires au paracortex ou pseudocortex des graptolithes, ainsi que des dépôts fibrillaires similaires à l'eucortex des graptolithes (Mierzejewski & Kulicki, 2003).

3. Phylogénie des ptérobranches et évolution du coenecium

Nous avons vu que le coenecium de *Rhabdopleura* et le rhabdosome des graptolithes sont unis par de nombreuses similarités structurales et ultrastructurales. Une analyse cladistique récente basée sur les caractères morphologiques du coenecium montre en effet que *Rhabdopleura* appartient à la classe Graptolithina à l'exclusion de *Cephalodiscus* (Melchin *et al.*, non publié) (Fig. 19). Par conséquent, le terme Graptolithina désignera maintenant un groupe unissant *Rhabdopleura* et les autres graptolithes éteints. Le terme Pterobranchia désignera un groupe unissant *Cephalodiscus* et Graptolithina. Le terme coenecium s'appliquera également au rhabdosome des graptolithes.

L'ultrastructure de *Cephalodiscus* est encore méconnue. Jusqu'à présent, les études ultrastructurales du coenecium de *Cephalodiscus* sont limitées à un échantillon mal préservé de *C. inaequatus* (= *C. hodgsoni*) (Urbanek, 1976), un échantillon non identifié appartenant au sous-genre *Orthoecus* (Andres, 1980), et aux épines de *C. graptolitoides* (Dilly, 1993). Une étude plus approfondie de l'ultrastructure du coenecium de trois espèces de *Cephalodiscus* a été conduite dans les années 1980 par P.N Dilly, A. Urbanek et P. Mierzejewski, mais n'a jamais été publiée (Mierzejewski & Kulicki, 2001). Dans le contexte phylogénétique décrit plus haut, *Cephalodiscus* est un groupe externe à Graptolithina. Il est donc nécessaire de connaître l'ultrastructure de *Cephalodiscus* afin de savoir si les caractères unissant *Rhabdopleura* et les autres membres de Graptolithina sont des synapomorphies de Graptolithina, ou si certains d'entre eux sont des plésiomorphies de Pterobranchia.

Notre étude vise donc à décrire l'ultrastructure du coenecium d'un membre de chacun des trois principaux sous-genres de *Cephalodiscus*, *C. (Orthoecus) densus*, *C. (Cephalodiscus) hodgsoni*, et *C. (Idiothecia) nigrescens*, au moyen de la microscopie électronique à transmission et à balayage. Nous avons décrit les types de fibrilles présentes,

leur organisation, ainsi que l'organisation globale du coenecium. Nous avons notamment mis en évidence la présence chez *Cephalodiscus* de bandes de croissance similaires au cortex des graptolithes.

ARTICLE

***Cephalodiscus* cortical tissue evolved before the origin of the Graptolithina.**

PAUL GONZALEZ & CHRISTOPHER B. CAMERON

Cet article est en cours de préparation et sera prochainement soumis au journal :
Invertebrate Biology.

Abstract

The ultrastructure of the coenecium of *Cephalodiscus hodgsoni*, *Cephalodiscus nigrescens* and *Cephalodiscus densus* was characterized using transmission and scanning electron microscopy. The coenecium of *Cephalodiscus* is composed of layers of coenecial material, laid down one upon the next and separated by sheets. These layers are organized in a similar way to the graptolite cortex. A superposition of layers composed of fibrils arranged in parallel, similar to the graptolite eucortex, is present in *C. densus*. Layers composed of randomly oriented fibrils similar to the graptolite paracortex, as well as accumulation of sheets delineating reduced layers devoid of fibrillar material, similar to the graptolite pseudocortex, are present in the three species studied. The coenecia of the three species under consideration are composed of thin (16-23 nm) long and straight fibrils, similar to fibrils in the fuselli of *Rhabdopleura*. Thicker (120-280 nm) straight or bent fibrils, similar to graptolite cortical fibrils, were found in the outer walls of the coenecium of *C. hodgsoni*. The cortical-like arrangement of the coenecium of *Cephalodiscus* suggests that the cortex is ancestral to the Pterobranchia.

Introduction

The hemichordate class Pterobranchia are colonial or pseudocolonial zooids that secrete a sclerotized, collagenous domicile called a coenecium (Towe & Urbanek 1972; Armstrong *et al.*, 1984). Like the enteropneust hemichordates, pterobranchs possess a three-part body plan. The prosome consists of a creeping cephalic shield, which they use to secrete the coenecium (Dilly, 1986), the mesosome is extended into one or more pairs of tentaculated arms used for filter feeding, and the metasome includes the gut, the gonad(s) and a contractile stalk which connects the asexually budded zooids within a colony. The Pterobranchia includes two subgroups: the cephalodiscids (Cephalodiscidae Harmer 1905 and Eocephalodiscidae Kozłowski 1949) and the Graptolithina, a group that includes

Rhabdopleura (Melchin *et al.*, unpublished). The morphology of the coenecium forms the basis of pterobranch taxonomy and phylogenetic studies (Bulman, 1970; Markham, 1971; Melchin *et al.*, unpublished).

Synapomorphic features of the Graptolithina include the condition that individuals in the colony are serially budded in an organized pattern and retain a connection by stolons throughout their lifespan. They also are united by possession of a sclerotized larval vesicle (prosicula) where the larva undergoes metamorphosis (Stebbing, 1970; Kozłowski, 1971; Dilly, 1985; Melchin *et al.*, unpublished). In addition, the increments (fuselli) that form the creeping tubes of the coenecium are half rings that form a regular zigzag pattern and those on the upright tubes are similar or regularly arranged full rings (Kozłowski, 1966). The coenecium is composed of primarily secreted fusellar tissue and secondarily secreted cortical layers. At the ultrastructural level, the fusellar tissue appears as a space, delineated by sheets, enclosing a fabric composed mainly of fusellar fibrils that are characteristically wavy, branching and anastomosing, forming a spongy three-dimensional meshwork (Urbanek & Towe, 1974). Fusellar fibril diameters vary between 60 and 110 nm (Mierzejewski & Kulicki, 2003). Secreted over the primary fusellar tissue is secondarily secreted cortical tissue. The cortical tissue is composed of sheets that are separated by an electron-lucent space. The cortical space may contain cortical fibrils that are straight, thick (100 nm – 1 µm) and parallelly arranged (referred to as a eucortex), or non-cortical fibrils that are arranged randomly (referred to as a paracortex) or may be devoid of fibrils (referred to as a pseudocortex) (Urbanek & Mierzejewski 1984). *Rhabdopleura* is the sole living graptolite.

Cephalodiscids lack a serially branching stolon system. Instead, asexually produced zooids bud from a common ciliated disk (Lester, 1985). Larvae do not construct a prosicula and zooids only contribute to coenecium construction as adults (Gilchrist, 1915, 1917; John, 1932). Mature zooids may detach from the colony and move freely in the coenecium. The genus *Cephalodiscus* has been subdivided into three major subgenera, and one

monospecific subgenus, based on different types of coenecial organization: *Orthoecus* Andersson 1907, *Idiothecia* Ridewood 1907, *Cephalodiscus* Ridewood 1907, and *Acoelothecia* John 1931 (Ridewood, 1920; Markham, 1971). *Orthoecus* zooids live in individual tubes, bound together by a common mass of coenecial substance (Fig. 16A). *Idiothecia* zooids also live in individual tubes, but their arrangement in the common coenecial structure forms a branching structure (Fig. 16B). Growth is apical: recently detached buds migrate to the apex of the colony where they start building their own tube (Ridewood, 1918). As new tubes form, layers of common material are later secreted between them, leaving in some species a portion of the tube free (*Cephalodiscus levinseni* Harmer 1905, *Cephalodiscus gilchristi* Ridewood 1906). In other species, tubes are embedded in the common material along their whole length, and only thickened lips, oblique extensions of the tubes, are externally visible (*Cephalodiscus nigrescens* Lankester 1912, *Cephalodiscus agglutinans* Harmer & Ridewood 1913). *Cephalodiscus* coenecia lack individual tubes. Zooids move freely in a continuous cavity that opens to the exterior via ostia often placed along or at the end of irregular branching structures (Fig. 16C). *C. (Acoelothecia) kempfi* John 1931 coenecia lacks cavities, the zooids live on the outer surface of the structure (John 1931). *Atubaria heterolopha* Sato 1936 presumably does not possess a coenecium (Komai 1949).

It is not known if the coenecium of *Cephalodiscus* shows ultrastructural similarities with the graptolite-like fusellar and cortical fibrils, or if these structures are unique to Graptolithina. Published TEM studies on the ultrastructure of extant *Cephalodiscus* are limited to a poorly preserved coenecium of *Cephalodiscus (Cephalodiscus) inaequatus* Andersson 1907 (= *Cephalodiscus hodgsoni* Ridewood 1906) (Urbanek 1976), one unidentified species of the subgenus *Orthoecus* (Andres 1980), and the spines of *Cephalodiscus graptolitoides* Dilly 1993 (Dilly 1993). These studies show that the coenecium of *Cephalodiscus* is made of sheets and between the sheets are very thin straight fibrils (19-22 nm) randomly oriented and loosely dispersed in an electron-lucent matrix. Unpublished observations of P.N Dilly, A. Urbanek and P. Mierzejewski indicate

that *Cephalodiscus (Orthoecus) solidus* Andersson 1907 is identical except that the fibrils are arranged in a parallel or sub-parallel arrangement (Mierzejewski & Kulicki 2001).

In this study we characterize the coenecium of a representative species of each of the three major *Cephalodiscus* sub-genera: *Cephalodiscus (Orthoecus) densus* ANDERSSON 1907, *C. (Cephalodiscus) hodgsoni* and *C. (Idiothecia) nigrescens*, using transmission and scanning electron microscopy. We describe the ultrastructure of the coenecium, including the fibril types and their organization in order to address the issue of the homology between the growth increments of *Cephalodiscus* and the fusellar and cortical tissues of Graptolithina, and discuss the plesiomorphic state of cephalodiscids and Graptolithina.

Methods

Fragments of coenecium from three specimens identified as *C. (Cephalodiscus) hodgsoni* (Fig. 16C), *C. (Idiothecia) nigrescens* (Fig. 16B) and *C. (Orthoecus) densus* (Fig. 16A) were obtained from the pterobranch collection at the National Museum of Natural History (Smithsonian), Washington D.C. Specimens were stored in 70% EtOH, but the original fixation method is unknown. The identification of samples was determined by comparing the coenecia with the taxonomic literature.

Transmission electron microscopy

Pieces of coenecia were dissected, fixed in Karnovsky (5% glutaraldehyde + 4% paraformaldehyde) in 0.1M phosphate buffer at pH 7.3 for 2 hours, rinsed in phosphate buffer and post-fixed in 1% osmium tetroxyde in 0.1M phosphate buffer at pH 7.3 for 1h. Samples were then dehydrated in a graded series of ethanol solutions and embedded in Araldite (SPI supplies, West Chester, PA). Ultra-thin sections were cut on an ultramicrotome, mounted on copper or nickel grids and stained with phosphotungstic acid

for 5 minutes (*C. hodgsoni*, *C. nigrescens*), or with uranyl acetate (*C. densus*) for 30 minutes. Sections were observed with a Jeol JEM 100-S microscope.

Scanning electron microscopy

Pieces of coenecia were dissected, fixed in 4% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer at pH 7.4 and post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1M sodium cacodylate buffer. They were then dehydrated through a graded series of ethanol solutions, followed by critical point drying. After sputter coating with an alloy of gold-palladium, the specimens were examined with a FEI Quanta 200-3D scanning electron microscope.

Results

Transmission electron microscopy

The walls of the coenecium of *C. hodgsoni*, *C. nigrescens* and *C. densus* are composed of straight fibrils embedded in an electron-lucent matrix (Fig. 20, 21). The longest fibril observed was 75 μm long for *C. hodgsoni*, 58 μm for *C. nigrescens* and 70 μm for *C. densus*. The minimal length of fibrils could not be evaluated because the smallest fibrils on TEM micrographs represent transverse sections. The diameter of fibrils were 23 ± 3.5 nm ($N=50$) for *C. nigrescens*, 21 ± 3.8 nm ($N=50$) for *C. hodgsoni*, and 16 ± 3.3 nm ($N=50$) for *C. densus*. This fibrillar fabric is arranged in layers of irregular thickness, separated by conspicuous electron-dense lines, interpreted here as sheets, or membranes (Fig. 20, 21). These sheets occurred either individually (Fig. 20B, D, 21D) or in groups of between two and twelve sheets. Closely set sheets can separate to enclose foreign particles (Fig. 20B, F). The inner layer and outer layer of the tubes were always delineated by one or several sheets. The orientation of fibrils within the fabric was variable. In some places, their orientation was random (Fig. 20A, C, E, 21A) whereas in others, it was organized. In the region closest to the outer sheet, they were typically arranged parallel to the sheet (Fig.

20A, E). In these regions, fibrils were more numerous and more closely packed. In *C. densus*, the outermost layers of the coenecium showed a clear pattern of parallel arrangement of the fibrils. In each layer, fibrils run parallel to each other, but the orientation of fibrils was different between adjacent layers (Fig. 21B, C, D).

Scanning electron microscopy

In the three species studied, the outer surfaces of the coenecium, were usually featureless and smooth (Fig. 22A, F). This smooth texture probably corresponds to the sheet fabric covering the growth bands. The layered arrangement of the growth bands were visible where the walls of the coenecium were torn (Fig. 22A, C). As seen with TEM, the whole coenecium was composed of a superposition of these thin layers. The frequent occurrence of foreign material embedded between adjacent layers (Fig. 22F) suggests that the layers are deposited successively one upon the next. In certain regions, where the sheet fabric was peeled apart, the fibrillar material was exposed, showing fibrils in the same diameter range as those observed with TEM (Fig. 22C, D, E). In cross-sections of the walls, the three-dimensional arrangement of these fibrils was visible, showing the presence of a spongy meshwork (Fig. 22B). In *C. hodgsoni*, much thicker fibrils (120-280 nm, average: 170 ± 40 nm ($N=10$)) were visible on the outer surface of the coenecium (Fig. 22D, E). These fibrils were not arranged in bundles and showed no clear sign of a parallel orientation.

Discussion

Tubes of the *Cephalodiscus* coenecium do not show distinct, well-defined primary fuselli and secondary cortical layers that are characteristic of graptolites. Instead, they are comprised entirely of layers of variable thickness overlaid one upon the next and delineated by sheets, similar to the graptolite cortical tissue. In *C. (Orthoecus) densus*, the region between successive sheets possesses collagen fibrils that may be arranged in parallel, as in

the graptolite eucortex (Fig. 18). An identical type of organization was reported from *C. (Orthoecus) solidus* (unpublished data mentioned in Mierzejewski & Kulicki 2001), and thus may be restricted to the *Cephalodiscus* subgenus *Orthoecus*. Layers containing randomly oriented fibrils, and reduced layers devoid of fibrils are ubiquitous among *Cephalodiscus* subgenera. Their arrangement is similar to the graptolite paracortex and pseudocortex (Fig. 18). This cortical-type organization is also present in the spines of *C. hodgsoni* and *C. graptolitoides* (Dilly 1993, plate IV).

Assuming that the *Cephalodiscus* subgenera are monophyletic groups, spines appear to have evolved at least 3 times among cephalodiscids. They appear once at the base of the subgenus *Cephalodiscus*, once in *C. (Idiothecia) gilchristi*, and again in *C. (Orthoecius) graptolitoides*. Zooids of *C. graptolitoides* lengthen their spines by depositing successive globular or conical masses of coenecial material one upon the next, and thicken the spines with fresh secretions each time they move up the spine to feed (Dilly 1993). In *C. hodgsoni*, the spine walls are composed of annular layers that are ultrastructurally identical to those of the tubes. They are likely deposited as accumulation of thin trails creating a cortical-like structure. The multiple origins of spines in cephalodiscids calls into question the hypothesis that *C. graptolitoides* is a living graptolite based on the presence of spines (graptolite nema) (Dilly 1993).

Only one type of fibril was found in the coenecium of *Cephalodiscus* with TEM. As reported by Urbanek (1976) and Andres (1980), these fibrils are very thin, long and straight. They are similar in size and shape to the fibrils found in the fuselli of *Rhabdopleura* (Dilly 1971). No similar fibril type is known from other graptolites. SEM observations revealed a second type of fibrils in *C. (Cephalodiscus) hodgsoni*. Their diameter (120-280 nm) is in the same range as the cortical fibrils of *Rhabdopleura* (220-570 nm) and other graptolites (100-900 nm) (Mierzejewski & Kulicki 2003). The distribution of the three main fibril types in the Pterobranchia is shown in Table 1.

Despite the presence of different fibril types in the fuselli of *Rhabdopleura* (Dilly 1971) and other graptolites (Urbanek & Towe 1974), fuselli are considered homologous and an iconic feature of the Graptolithina (Melchin et al. unpublished). Here we find differences in fibril size and shape in the cortical tissue of *Cephalodiscus* but the macrostructure is indistinguishable from that seen in graptolites, suggesting that cortical tissue is plesiomorphic to the Pterobranchia. It is not obvious to us that collagen fibril type aids in the determination of tissue homology, as proposed by Urbanek (1976). Collagen fibril length may vary because short early fibril segments appear to be intermediates in the formation of mature long fibrils (Kadler et al. 1996). Fibril diameter may also vary depending on the packaging of the molecules (Hulmes 2002). Moreover if fibril types are functionally neutral, then changes in fibril composition may be common. For these reasons, we treat microscopic characterizations of fibrillar components as phylogenetically non-informative and independent from the macroscopic tissue types of the pterobranch coenecium.

Among the graptolites, primary fusellar tissue forms the foundation of the coenecium and the secondary cortical tissue is then secreted as the outermost layers. This order of developmental patterning has given rise to the hypothesis that cortical tissue evolved secondarily after fusellar tissue. Here we find that the coenecium of *Cephalodiscus*, the sister group to graptolites, does not show the high degree of differentiation between fuselli and cortex characteristic of graptolites. Instead, cortical-like tissue comprises the coenecium of *Cephalodiscus*, and well-defined annular fuselli are absent. These findings suggest that cortical tissue is ancestral to the Pterobranchia and that differentiation into morphologically and ultrastructurally distinct fusellar and cortical tissues evolved secondarily at the root of the graptolites.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the staff of the National Museum of Natural History

(Smithsonian) for providing the coenecia used in this study and for their assistance during the stay of P.G at the facility. Funding for this project was provided by an NSERC grant to C.B.C.

CONCLUSIONS

Le coenecium de *Cephalodiscus* n'est pas organisé selon le patron typique des graptolithes, caractérisé par des fuselli primaires bien définis recouverts de couches corticales secondaires. Il est composé de couches d'épaisseur variable apposées les unes sur les autres et délimitées par des feuillettes. Ce type d'organisation est similaire au cortex des graptolithes. Chez *C. (Orthoecus) densus*, il existe une superposition de couches composées de fibrilles orientées en parallèle et séparées par des feuillettes. Ce type d'arrangement est similaire à l'eucortex des graptolithes (Fig. 18). Un patron d'organisation similaire existerait également chez *C. (Orthoecus) solidus* (données non publiées mentionnées dans Mierzejewski & Kulicki, 2001), et pourrait donc être restreint chez *Cephalodiscus* au sous-genre *Orthoecus*. Des couches contenant des fibrilles orientées de façon aléatoire, ainsi que des couches réduites dépourvues de fibrilles, sont présentes chez les trois principaux sous-genres de *Cephalodiscus*. Leur arrangement est similaire au paracortex et au pseudocortex des graptolithes (Fig. 18). Cette organisation de type corticale est également présente au niveau des épines de *C. hodgsoni* et de *C. graptolitoides* (Dilly, 1993).

Nos observations au MET n'ont permis de mettre en évidence qu'un seul type de fibrilles. Ces fibrilles très fines (16 - 23 nm), longues et droites sont similaires aux fibrilles observées dans les fuselli de *Rhabdopleura* par Dilly (1971). Ce type de fibrilles est absent chez les graptolithes éteints. Nos observations au MEB ont révélé un second type de fibrilles chez *C. hodgsoni*. Leur diamètre (120-280 nm) correspond à celui des fibrilles corticales de *Rhabdopleura* (220-570 nm) et des autres graptolithes (100-900 nm) (Mierzejewski & Kulicki, 2003). La répartition des trois principaux types de fibrilles chez Pterobranchia (Tableau 1) montre que le type de fibrilles varie indépendamment de leur organisation et des structures macroscopiques dont elles font partie.

Malgré des différences dans les types de fibrilles présents dans les fuselli de *Rhabdopleura* (Dilly, 1971) et des autres graptolithes (Urbanek & Towe, 1974), leurs fuselli sont homologues, et la présence de fuselli est considérée comme une synapomorphie de Graptolithina (Melchin *et al.*, non publié). La macrostructure du tissu cortical de *Cephalodiscus* est indiscernable de celle des graptolithes, ce qui suggère que le tissu cortical est une plésiomorphie de Pterobranchia. En revanche la taille et la forme des fibrilles qui composent le tissu cortical de *Cephalodiscus* diffèrent des fibrilles typiques du cortex des graptolithes. Selon nous, la prémisse selon laquelle le type de fibrilles est un indicateur fiable de l'homologie du tissu (Urbanek, 1976) n'est pas nécessairement valide.

L'évolution du tissu cortical est généralement considérée comme ultérieure à celle du tissu fusellaire, car chez les graptolithes, le cortex est sécrété secondairement, par-dessus les fuselli. Ici, nous avons montré que le coenecium de *Cephalodiscus*, le groupe frère des graptolithes, ne possède pas le haut degré de différenciation entre fuselli et cortex caractéristique des graptolithes, mais possède un tissu de type cortical, en l'absence de fuselli bien définis. Ces nouvelles données suggèrent que le tissu cortical est ancestral à Pterobranchia et que la différenciation entre tissus fusellaire et cortical a évolué secondairement dans la lignée des graptolithes.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans ce mémoire sont regroupées trois études qui ont pour commun l'utilisation des hémichordés actuels pour répondre à des questions concernant l'évolution des deutérostomes. Ces études illustrent la diversité des questions pour lesquelles l'étude des hémichordés peut apporter des éléments de réponse, ainsi que la variété d'approches et de techniques qui peuvent être utilisées pour aborder ces problématiques. Pour conclure ce mémoire, les résultats de ces études sont ici replacés dans un contexte plus large, et un aperçu des nombreuses questions que soulèvent nos résultats est donné.

Nous avons vu au chapitre 1 que les comparaisons entre le système de filtration d'un entéropeuste et celui des chordés montrent que l'ancêtre commun des deutérostomes, qui possédait un pharynx perforé de fentes pharyngiennes dépourvu d'endostyle, s'alimentait possiblement par filtration pharyngienne. Notre étude permet de superposer à l'arbre des deutérostomes un scénario d'évolution des stratégies et structures de filtration chez ce groupe. C'est une étape indispensable vers la compréhension des causes sélectives qui ont dirigé l'évolution de leurs structures et stratégies de filtration, telles que la relation entre la taille de ces structures et leur efficacité énergétique, ou la relation entre les différents modes de vie observés chez les deutérostomes actuels (sessile ou mobile, infaunal ou épibenthique, colonial ou solitaire) et leurs méthodes de filtration. L'évolution d'un endostyle capable de produire un filet muqueux structuré s'est déroulée dans la lignée menant aux chordés actuels, et la filtration pharyngienne a été conservée chez les deux groupes de chordés non vertébrés actuels, Urochordata et Cephalochordata. Chez les vertébrés filtreurs, l'augmentation de la taille du pharynx s'est accompagnée de l'évolution d'une pompe musculaire qui remplace les surfaces ciliées pour le pompage de l'eau. En revanche, dans la lignée des hémichordés, la plupart des entéropeustes ont abandonné la filtration pharyngienne et se sont spécialisés dans la déposivorie. La fonction des fentes pharyngiennes chez les espèces non filtreuses pourrait impliquer le rôle de support joué par le squelette rigide des fentes, nécessaire à leur mode de vie infaunal, ainsi que l'extraction partielle de l'eau contenue dans les sédiments ingérés avant leur passage dans le tube digestif. Une meilleure résolution de la phylogénie de la classe Enteropneusta, ainsi qu'une

connaissance plus complète de la répartition des espèces filtreuses au sein de ce groupe, sont nécessaires afin d'évaluer combien de fois ce type d'alimentation a évolué ou a été perdu de façon indépendante. Les ptérobranches, eux, ont évolué vers un mode de vie sessile associé à un type d'alimentation utilisant des bras et tentacules ciliés. Ce changement de stratégie pourrait être une réponse à la réduction de la taille du pharynx, qui augmente la résistance au passage de l'eau et diminue ainsi l'efficacité énergétique du système. Chez les échinodermes, les fentes pharyngiennes ont disparu totalement et la filtration à l'aide de bras et tentacules a certainement évolué de façon indépendante chez plusieurs classes (Crinoidea, Ophiuroidea et Holothuroidea).

L'analyse comparative de la morphologie fonctionnelle des invertébrés deutérostomiens n'est pas la seule approche qui permet d'étudier les premières étapes de l'évolution des deutérostomes. Il est également possible de coupler une approche morphologique avec l'analyse des patrons d'expression des gènes qui régulent le développement de certaines structures. Ainsi, nous avons tenté de déterminer l'expression d'un facteur de transcription spécifique au développement de l'adénohypophyse des vertébrés et de la fosse de Hatschek des céphalochordés chez un entéropeuste. Notre étude (chapitre 2) a été peu concluante, mais l'utilisation de techniques de marquage plus spécifiques (comme l'hybridation *in-situ*), appliquées à un plus grand nombre de gènes associés au développement de l'adénohypophyse pendant le développement embryonnaire, pourrait apporter une réponse à de nombreuses questions. Les gènes et réseaux génétiques qui régulent le développement de l'adénohypophyse chez les vertébrés sont-ils également présents chez les hémichordés? Si oui, sont-ils déployés de façon similaire, et dans une structure homologue à l'adénohypophyse, ou ont-ils été co-optés secondairement pour cette fonction? L'origine de l'adénohypophyse des vertébrés est-elle antérieure à l'apparition des premiers chordés? L'évolution de l'adénohypophyse a-t-elle mis en jeu une succession de structures ancestrales chémoréceptrices qui auraient peu à peu perdu leur fonction sensorielle avant de tomber sous le contrôle exclusif du système nerveux central? À long terme, l'intégration d'études à l'échelle moléculaire et d'études visant à mieux connaître la

morphologie des hémichordés, ainsi que les structures ou types de cellules sensorielles, neurosécrétrices et endocrines qu'ils possèdent, nous permettra d'obtenir un tableau complet de l'évolution de l'axe hypothalamo-hypophysaire, un caractère omniprésent chez les vertébrés et qui régule certaines des fonctions les plus cruciales à leur survie, telles que la croissance et la reproduction.

Les hémichordés ne sont pas seulement de bons outils pour étudier l'évolution des deutérostomes et l'origine des chordés. Leur histoire évolutive est riche et présente un intérêt qui lui est propre. Les ptérobranches actuels sont rares et peu étudiés. Entre vingt et trente espèces actuelles sont connues. En revanche, la démonstration récente des liens de parenté étroits entre ptérobranches et graptolithes fait maintenant de Pterobranchia, et par extension de Hemichordata, un groupe dont la diversité était jusqu'à présent insoupçonnée. Nous ne connaissons des graptolithes que les restes fossilisés de leur coenecium. Pour inférer les caractéristiques des graptolithes éteints, il est donc indispensable de connaître le coenecium des ptérobranches actuels. Notre étude (chapitre 3), la première sur l'ultrastructure du coenecium de *Cephalodiscus*, a montré que le tissu cortical, généralement considéré comme une synapomorphie des graptolithes, est apparu antérieurement à l'origine de ce groupe. Il est maintenant nécessaire de mieux connaître les mécanismes de sécrétion du coenecium chez les ptérobranches actuels afin de pouvoir inférer, à partir des caractéristiques du coenecium des graptolithes éteints, la nature de leurs zooïdes : leur taille, leur degré de mobilité, le degré de différenciation entre les zooïdes de la colonie, ou encore les caractéristiques de leur cycle de vie. Il sera également nécessaire de s'interroger sur l'importance fonctionnelle des différents types de morphologies coeneciales chez *Cephalodiscus*, à toutes les échelles de taille (organisation des fibrilles de collagènes, organisation des couches fusellaires et corticales, organisation macroscopique du coenecium) et de leur relation avec le milieu et le mode de vie des zooïdes.

. L'étude des hémichordés connaît un renouveau depuis les dix dernières années, notamment grâce au séquençage du génome de l'entéropneuste *Saccoglossus* et à la

résolution toujours plus précise de la phylogénie des deutérostomes. Ce mémoire illustre comment l'étude des hémichordés à plusieurs échelles (moléculaires, ultrastructurales, morphologiques et fonctionnelle) permet d'affiner notre compréhension des premières étapes de l'évolution de Deuterostomia et de sa diversification.

TABLEAUX

Table 1. Distribution of fibril types in the Pterobranchia.

Fibril type	Diameter	Shape	Taxon	Localization
fusellar ^{1,2}	60-110 nm	wavy, branching, anastomosing	Graptolithina	fuselli, paracortex
cortical ^{1,2}	100 nm -1 µm	straight	Graptolithina	eucortex
		straight or slightly bent	Rhabdopleurids	fusellar collar, eucortex
? ³	4-30 nm	straight	<i>Rhabdopleura</i>	fuselli
? ⁴	16-23 nm	straight	<i>Cephalodiscus</i>	paracortex
			<i>Cephalodiscus</i> (<i>Orthoecus</i>)	eucortex
? ⁴	120-280 nm	straight or bent	<i>C. hodgsoni</i>	?

¹Mierzejewski & Kulicki, 2001. ²Mierzejewski & Kulicki, 2003. ³Dilly, 1971. ⁴present study.

FIGURES

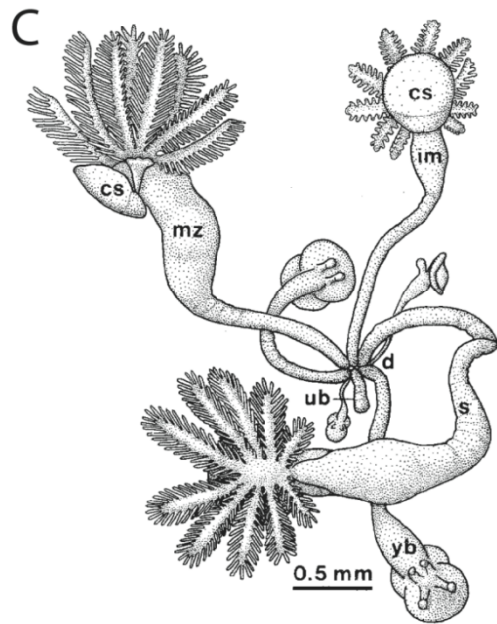
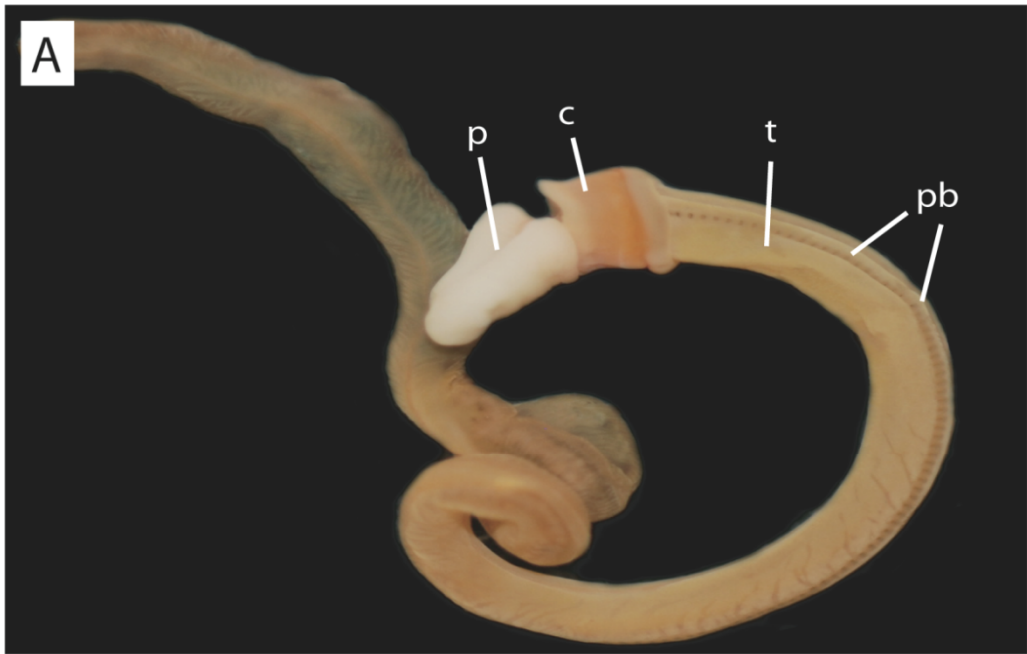


Figure 1. Diversité de Hemichordata. A, Enteropneusta (*Protoglossus graveolens*). B, Pterobranchia, genre *Rhabdopleura*. C, Pterobranchia, genre *Cephalodiscus*. c, collet ; cs, bouclier céphalique ; d, disque basal ; est, estomac ; im, zooïde immature ; mz, zooïde mature ; p, proboscis ; pb, pores branchiaux ; ph, pharynx ; s, pédoncule contractile ; t, tronc ; tc, tentacules ; ub, bourgeon indifférencié ; yb, jeune bourgeon. B, modifié d'après Sato et al. (2009). C, modifié d'après Lester (1985).

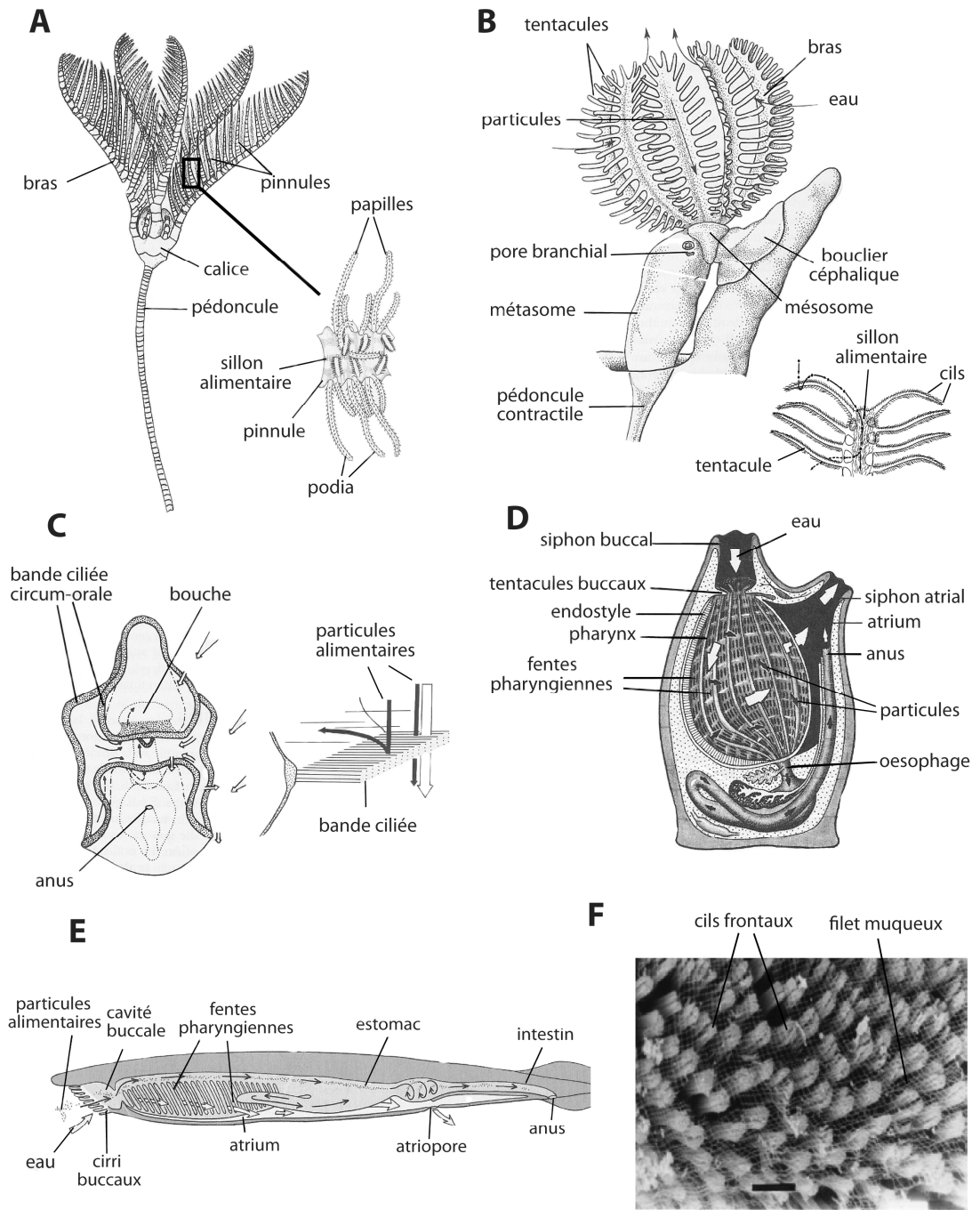


Figure 2. Diversité des structures de filtration chez les invertébrés deutérostomiens. A, crinoïde. B, ptérobranche (*Cephalodiscus*). C, larve dipleurula. D, urochordé ascidien. E, céphalochordé. F, filet muqueux d'ascidien. *A, C, D, E, modifiés d'après Ruppert et al. (2004); A détail, modifié d'après Halanych (1993); B modifié d'après Lester (1985); F, tiré de Bone et al. (2003).*

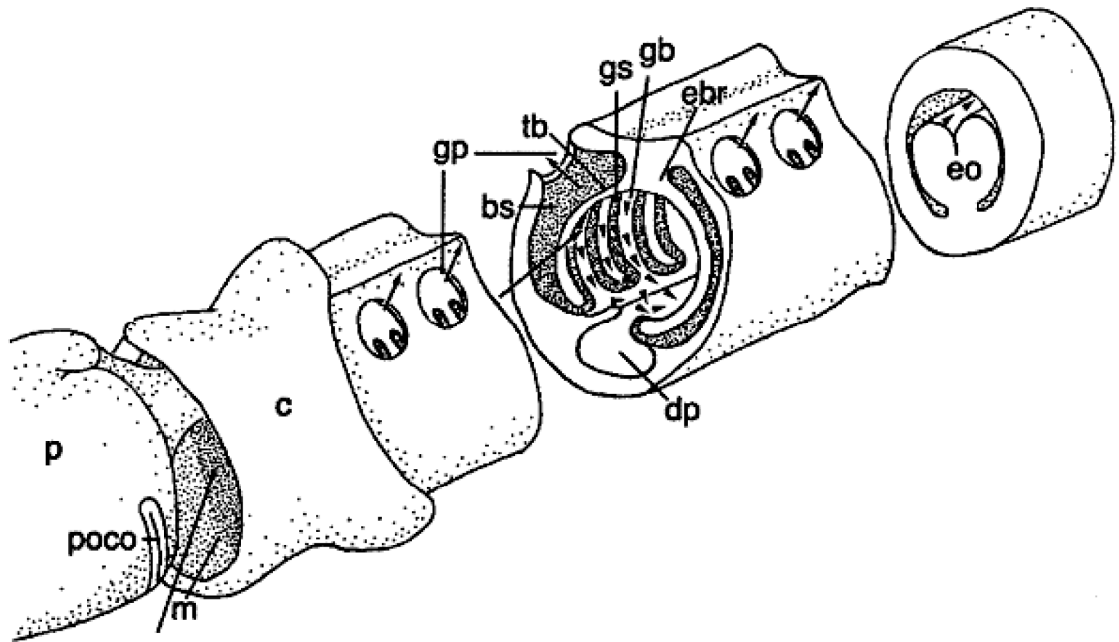


Figure 3. Organisation du système de filtration de l'entérozoéaire *Harrimania planktophilus*. Le courant inhalant (flèches longues) entre par la bouche, située entre le proboscis et le collet. Les particules en suspension (têtes de flèches) sont capturées par les cils des barres branchiales, transportées ventralement vers le pharynx ventral (digestif), puis postérieurement vers l'oesophage. L'eau filtrée (flèches courtes) sort du pharynx par les fentes branchiales, et passe vers le milieu extérieur par les sacs branchiaux, puis par les pores branchiaux épidermiques. bs, sac branchial ; c, collet ; dp, pharynx digestif ; ebr, sillon épibranchial ; eo, oesophage ; gb, barre branchiale primaire ; gp, pore branchial ; gs, fente pharyngienne ; m, bouche ; p, proboscis ; poco, organe pré-oral cilié ; tb, barre branchiale secondaire. *Tiré de Cameron (2002b).*

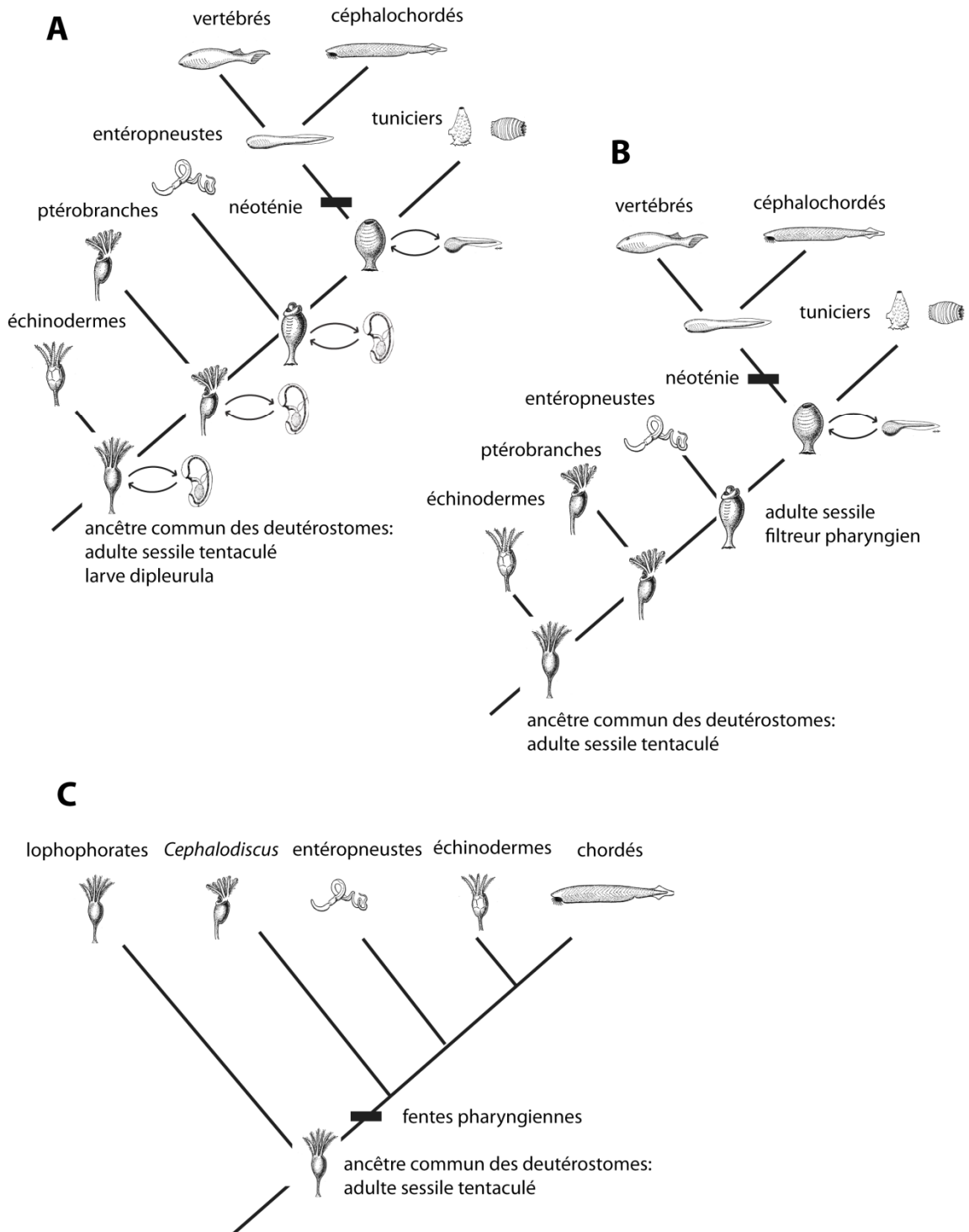


Figure 4. Trois hypothèses majeures d'évolution des deutérostomes. A, Hypothèse de Garstang (1928). B, hypothèse de Romer (1967). C, hypothèse des calcichordés (Jefferies, 1986). Ces trois hypothèses reconstruisent l'ancêtre commun des deutérostomes comme un organisme sessile filtrant avec des bras et tentacules. L'hypothèse de Garstang stipule que cet ancêtre commun possédait une larve ciliée de type dipleurula. Cette larve aurait tout d'abord acquis au cours de l'évolution les caractéristiques de la larve têtard des ascidiens (tube neural et notochorde). L'adulte de cette larve aurait acquis des fentes pharyngiennes ainsi qu'un endostyle, et ces structures de filtration, ainsi que la maturité sexuelle, auraient ensuite été transférées à la larve têtard par néoténie. Ce nouvel adulte mobile possédant des fentes pharyngiennes, un endostyle, une notochorde, un tube neural dorsal, et une queue post-anale, serait l'ancêtre des céphalochordés et des vertébrés. L'hypothèse de Romer (1967) est semblable mais ne dérive pas la larve têtard des ascidiens d'une larve dipleurula. L'hypothèse des calcichordés est basée sur l'étude d'un groupe de fossiles du Paléozoïque, les carpoïdes, dont les caractères morphologiques, intermédiaires entre échinodermes et chordés, suggère la monophylie d'un taxon regroupant ces deux groupes. Selon cette hypothèse, l'ancêtre commun des deutérostomes serait un organisme possédant les caractéristiques du ptérobranche *Cephalodiscus*, dont les bras et tentacules seraient homologues aux bras et podia des crinoïdes ainsi qu'au lophophore des lophophorates.

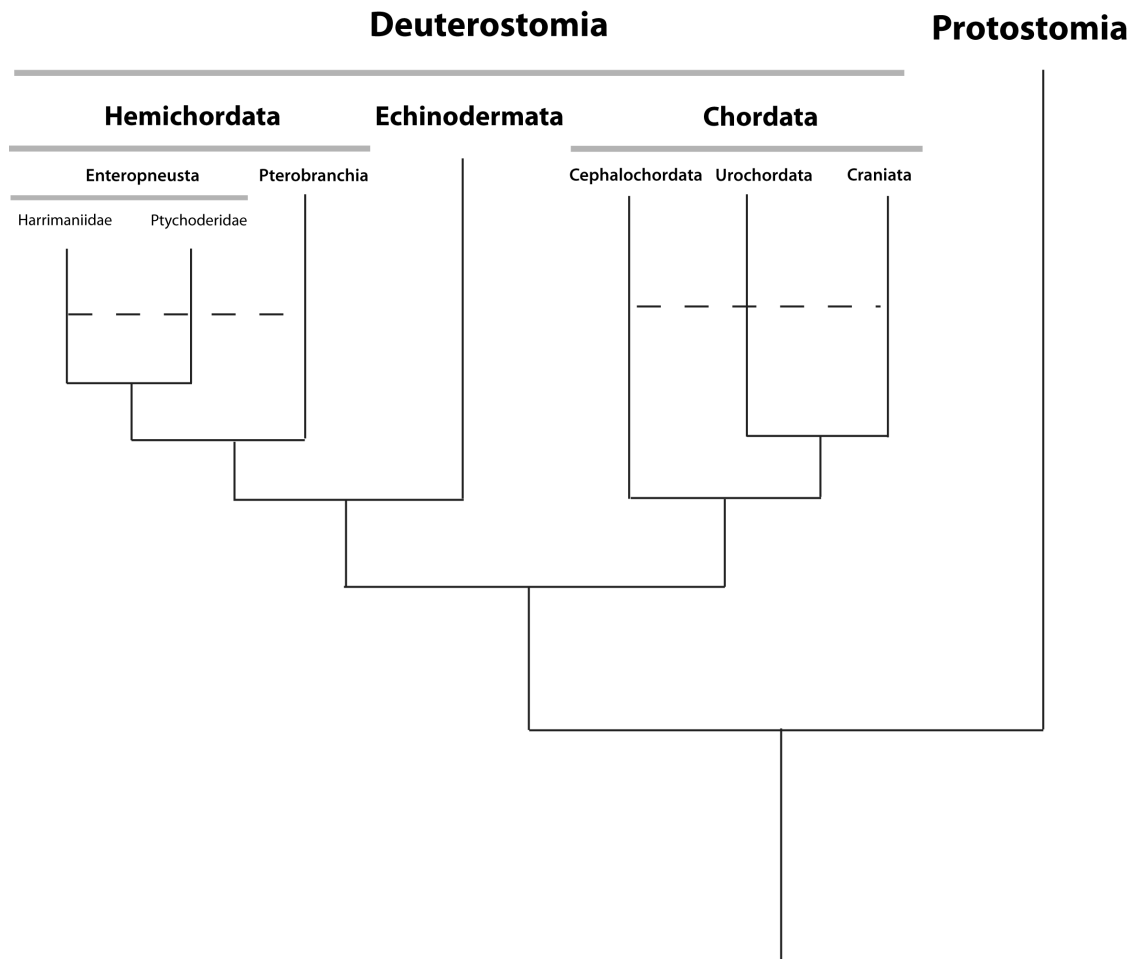


Figure 5. Arbre phylogénétique du super-embranchement Deuterostomia. Les hypothèses alternatives sont marquées en lignes pointillées ((Pterobranchia + Harrimaniidae) et (Cephalochordata + Craniata)). Xenoturbellida n'est pas représenté, mais pourrait être le groupe-frère de Ambulacraria (Bourlat *et al.*, 2006). Basé sur les analyses phylogénétiques de : Turbeville *et al.* (1994) ; Wada & Satoh (1994) ; Cameron *et al.* (2000) ; Winchell *et al.* (2002) ; Bourlat *et al.* (2003) ; Blair & Hedges (2005) ; Cameron (2005) ; Bourlat *et al.* (2006) ; Delsuc *et al.* (2008) ; Putnam *et al.* (2008).

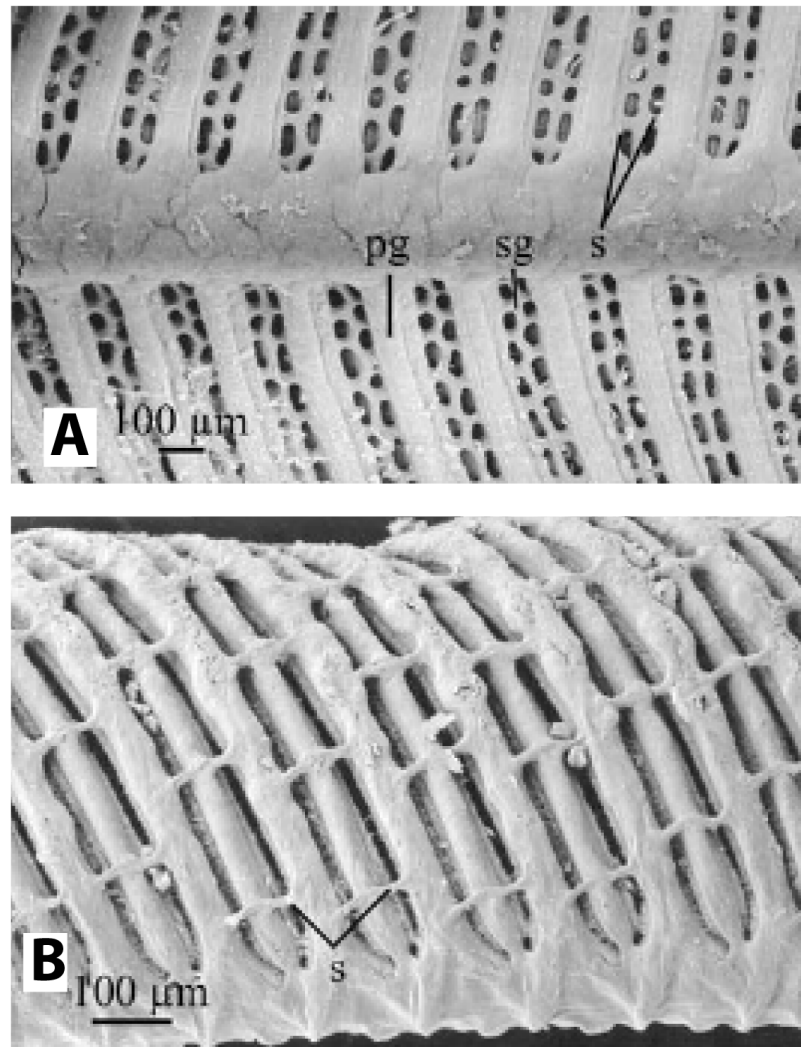


Figure 6. Comparaison du squelette pharyngien des entéropeustes et des céphalochordés. A, Squelette du pharynx de l'entéropeuste *Ptychodera* sp. (famille Ptychoderyidae), MEB. B, Squelette du pharynx du céphalochordé *Branchiostoma floridae*, MEB. pg, barre branchiale primaire ; sg, barre branchiale secondaire ; s, synapticules. D'après Cameron (2005).

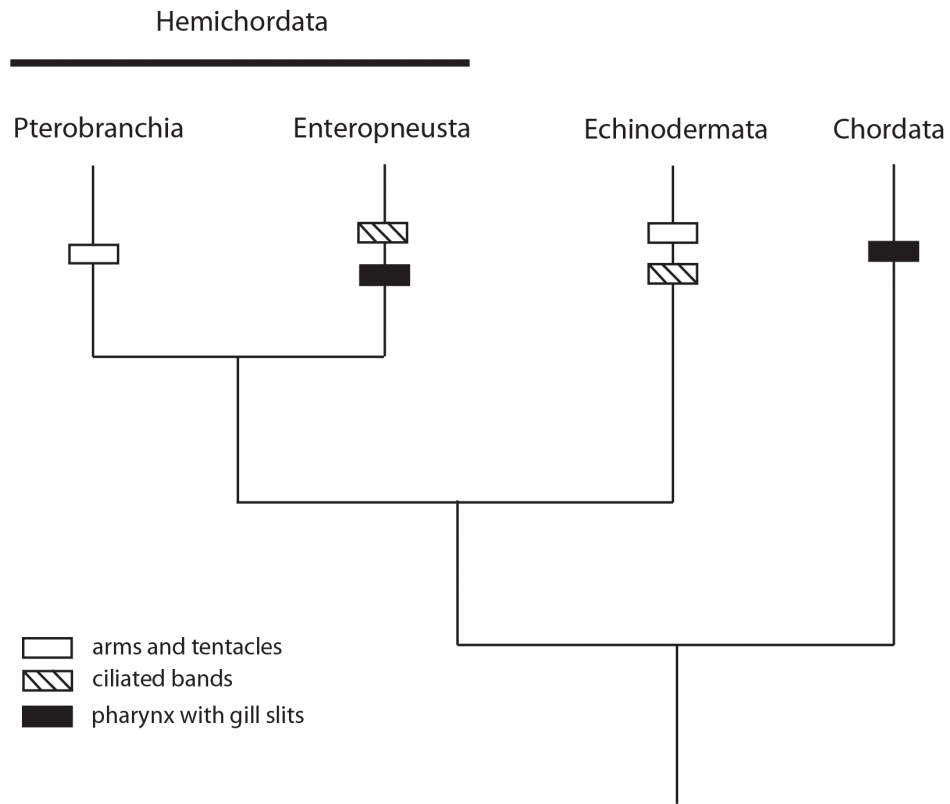


Figure 7. Filter-feeding structures in Deuterostomia. Prevailing hypotheses suggest that the ancestral deuterostome fed with either ciliated bands like those in enteropneust and echinoderm larvae or with arms and tentacles such as those in pterobranchs and echinoderms. The present study supports the hypothesis that a pharynx perforated with gill slits used in filter feeding is ancestral to the deuterostomes.

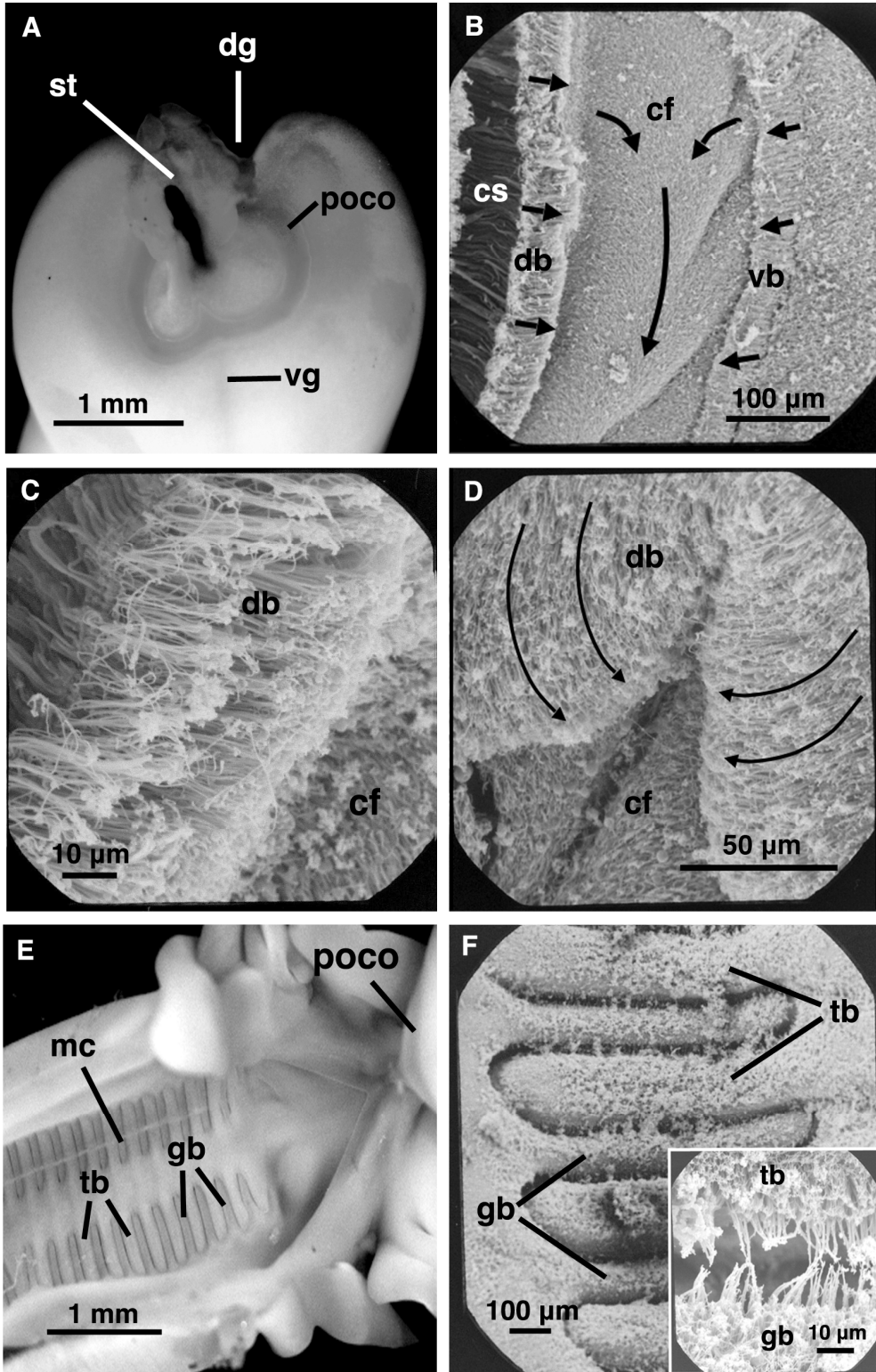


Figure 8. Filter-feeding structures in *Protoglossus graveolens*. A, light microscopic photograph of the anterior proboscis and pre-oral ciliary organ (POCO) of *Protoglossus graveolens*. The proboscis stalk was cut, exposing the severed, black skeleton and the POCO. B, Scanning electron microscopy (SEM) photograph of the lateral right end of the POCO. The arrows show the beating direction of cilia. A tear in the preparation shows the columnar cells that form the ciliated bands. C, SEM image of cilia on the POCO dorsal band. D, the medio-ventral part of the dorsal POCO ciliated band. Arrows show the beating direction of the cilia. E, light microscopic photograph of the dorsal pharynx was taken after a ventral midline dissection. Particles bound in a mucous cord are floating freely above the pharynx, unable to reach the dissected ventral pharynx. F, SEM photograph of the dorsal pharynx. (inset: high magnification view of the lateral cilia between adjacent primary and secondary gill bars). cf, ciliated field ; cs, columnar cells ; db, dorsal band ; dg, dorsal groove ; gb, primary gill bar ; mc, mucous cord ; poco, pre-oral ciliary organ ; tb, secondary or tongue bar ; st, proboscis stalk ; vb, ventral band ; vg, ventral groove.

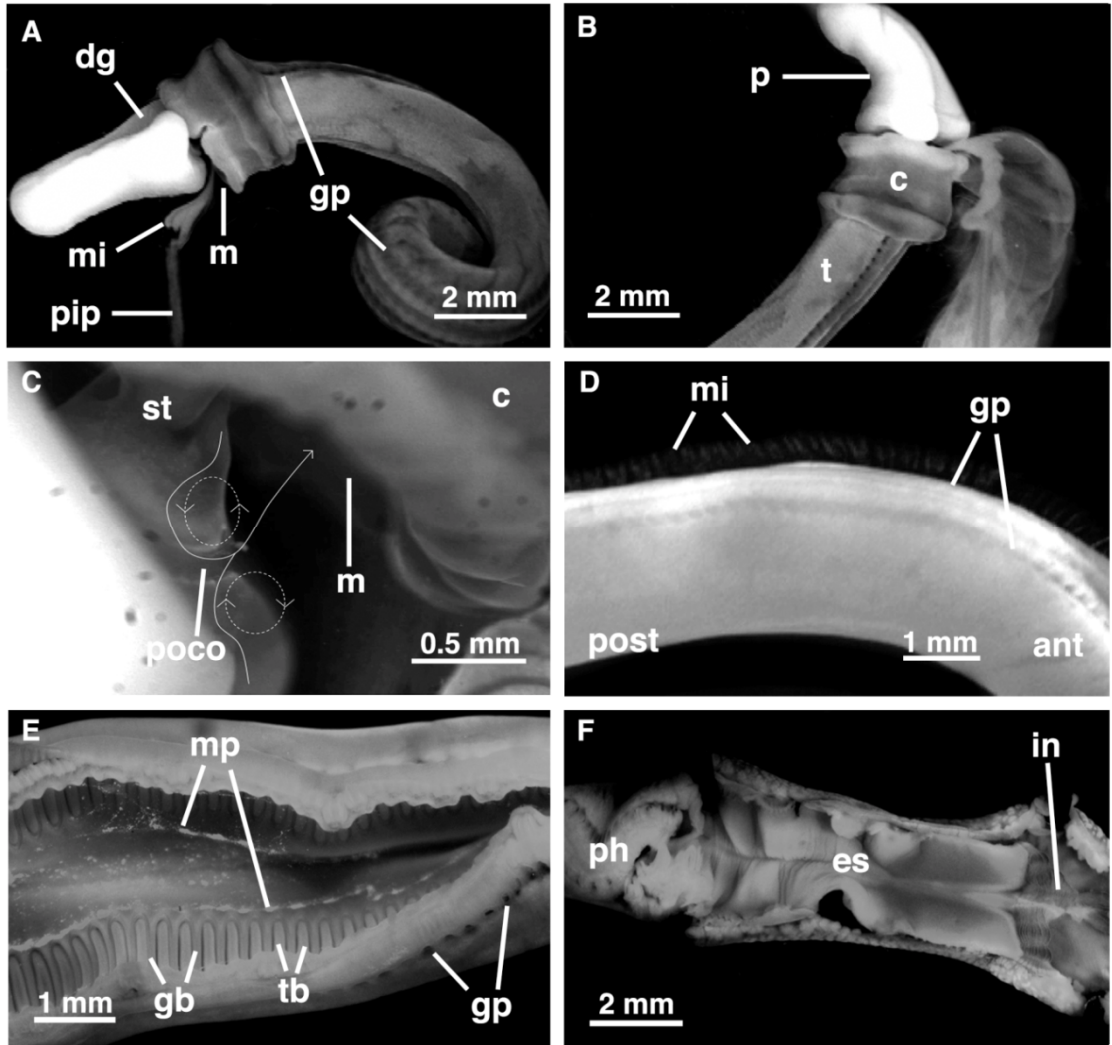


Figure 9. Light micrographs showing the pumping, filtering and digestive system of *Protoglossus graveolens* during filter feeding. A, B, flow of diluted milk entering the mouth. C, close-up of the buccal cavity. Dashed lines represent the vortices produced at the mid ventral region of the pre-oral ciliary organ. Solid lines represent the trajectory of particles into the centre of the mouth. D, diluted milk exiting the gill pores. E, mucus bound particles being transported to the ventral pharynx. F, dorsal dissection showing the muscular oesophagus. c, collar ; dg, dorsal groove ; es, oesophagus ; gp, gill pores ; in, intestine ; m, mouth ; mi, milk ; mp, mucus bound particles ; p, proboscis ; ph, pharynx ; poco, pre-oral ciliary organ ; pip, pipette ; st, proboscis stalk ; t, trunk.

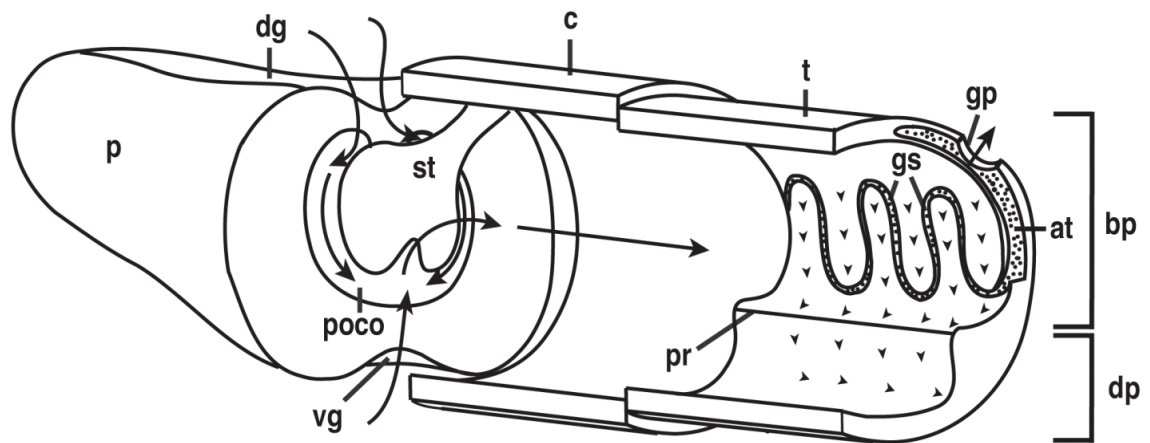


Figure 10. Organization of the filter-feeding morphology of *Protoglossus graveolens*. Water and particles (arrows) are pumped into the mouth by cilia of the pre-oral ciliary organ and pharyngeal gill bars then pass through the gill slits and atrial cavities and exit via the gill pores. Larger particles (arrowheads) are intercepted by cilia on the gill bars and are transported ventrally over the parabranchial ridge. Once in the digestive pharynx, the food laden mucous cord is transported posteriorly towards the oesophagus. at, atrial cavity ; bp, branchial pharynx ; c, collar ; dg, dorsal groove ; dp, digestive pharynx ; gp, gill pore ; gs, gill slits ; p, proboscis ; poco, pre-oral ciliary organ ; pr, parabranchial ridge ; st, stalk ; t, trunk ; vg, ventral groove.

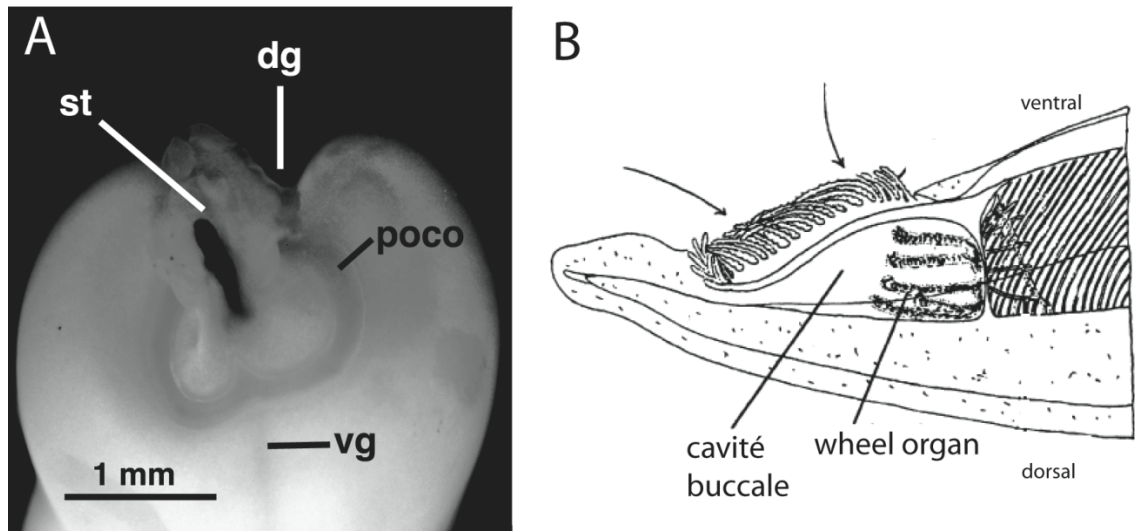


Figure 11. Organe pré-oral cilié (Enteropneusta) et wheel organ (Cephalochordata).
 A, face postérieure du proboscis de l'entéropneuste *Protoglossus graveolens*. Le pédoncule du proboscis est sectionné pour mettre en évidence l'organe pré-oral cilié. B, schéma représentant la partie antérieure du céphalochordé *Branchiostoma lanceolatum*. dg, sillon dorsal ; poco, organe pré-oral cilié ; st, pédoncule du proboscis (sectionné) ; vg, sillon ventral. A, tiré de Gonzalez & Cameron (2009) ; B, modifié d'après Riisgård & Svane (1999).

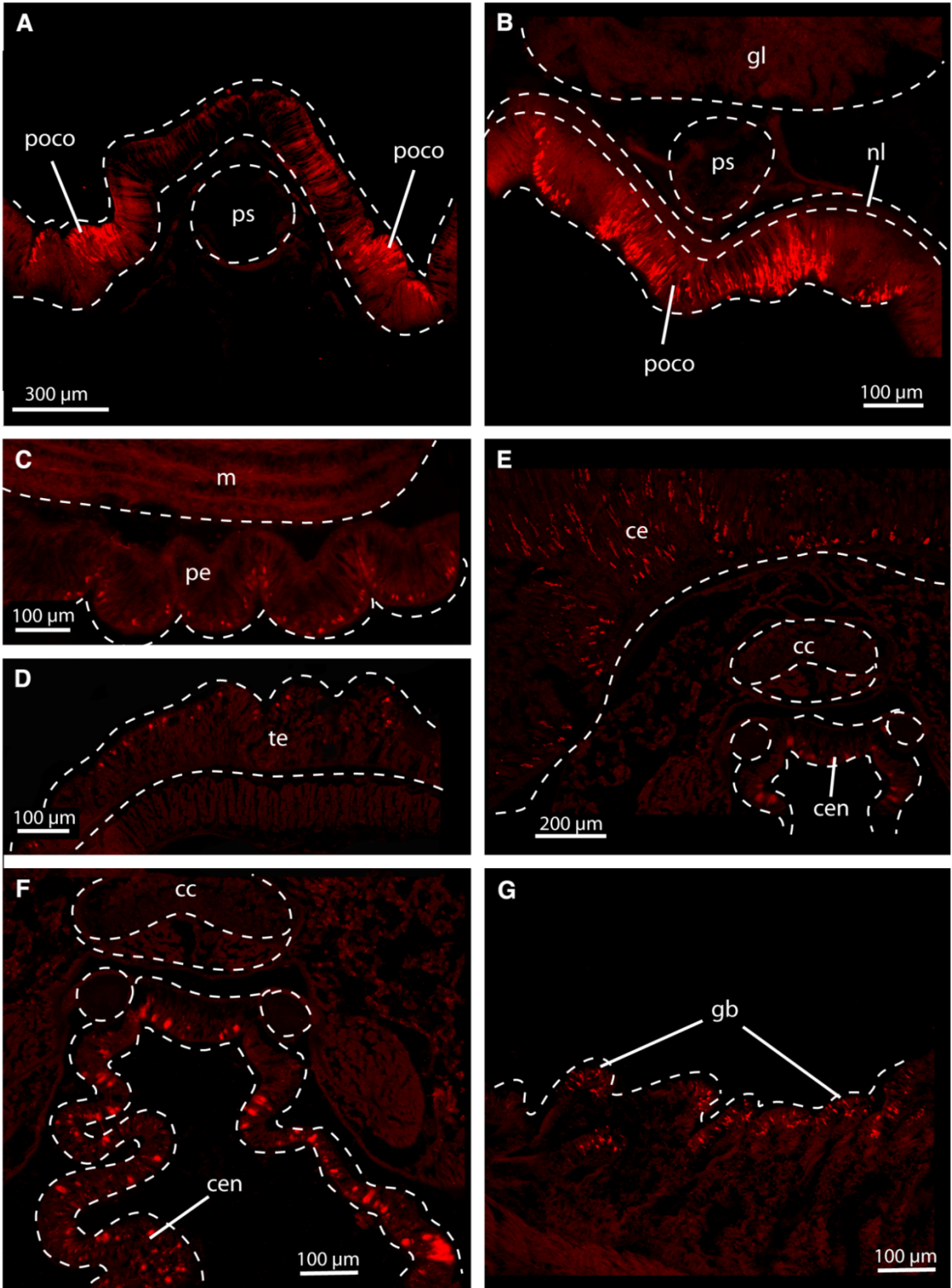


Figure 12. Localization of *Pit-1* immunoreactive cells in the proboscis, collar and trunk of the adult *Saccoglossus pusillus*. A, B, horizontal sections through the posterior part of the proboscis, showing immunoreactivity in cells of the pre-oral ciliary organ. C, horizontal section of the proboscis, showing immunoreactivity in cells of the general epidermis. D. transverse section of the trunk. E, transverse section of the collar, showing immunoreactive cells in the epidermis and endoderm. F, transverse section of the collar. G, transverse section of the pharynx, showing immunoreactive cells on the surface of the gill and tongue bars. cc, collar cord ; ce, collar epidermis ; cen, collar endoderm ; gb, gill bars ; gl, glomerulus ; m, proboscis muscles ; pe, proboscis epidermis ; poco, pre-oral ciliary organ ; ps, proboscis skeleton ; te, trunk epidermis.

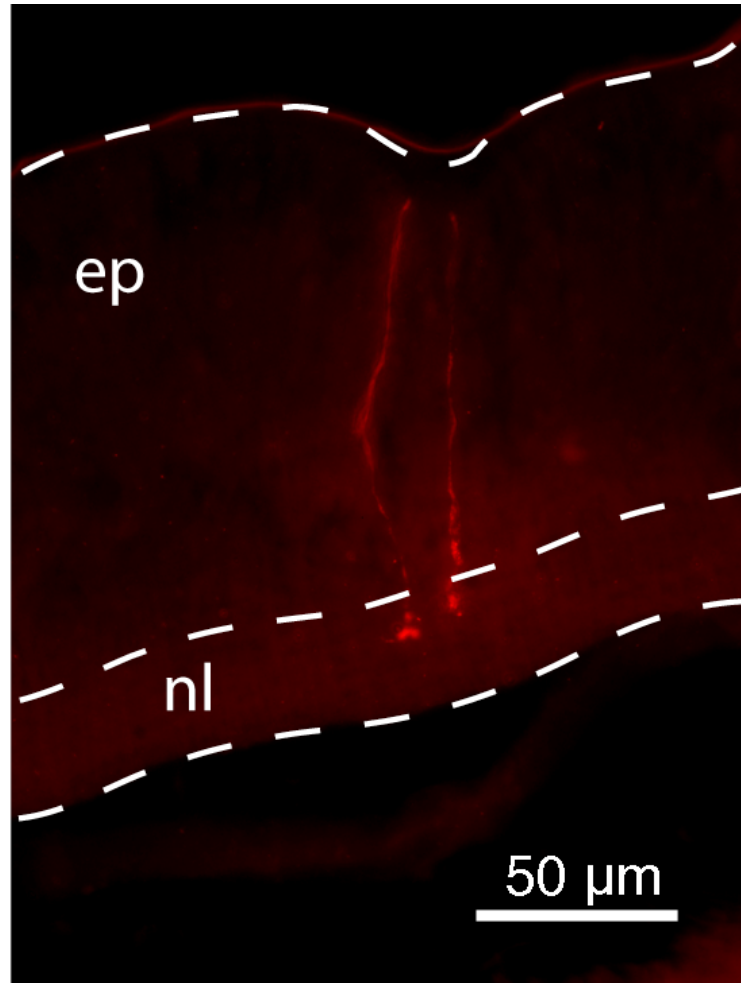


Figure 13. *Pit-1* immunoreactive cells in the pre-oral ciliary organ of *Saccoglossus pusillus*. ep, epidermis ; nl, basiepidermal nerve layer.

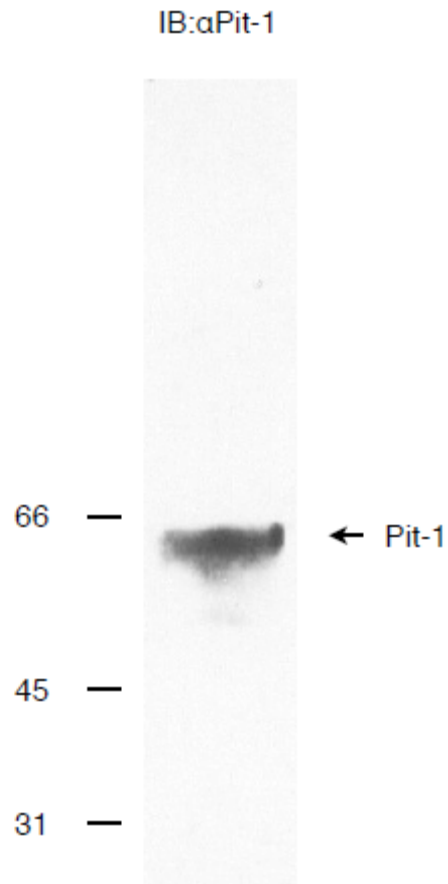


Figure 14. Western Blot analysis performed on protein extracts from adult *Saccoglossus pusillus*, using an antibody against *Pit-1*. A single band of molecular weight 63 KDa was identified.

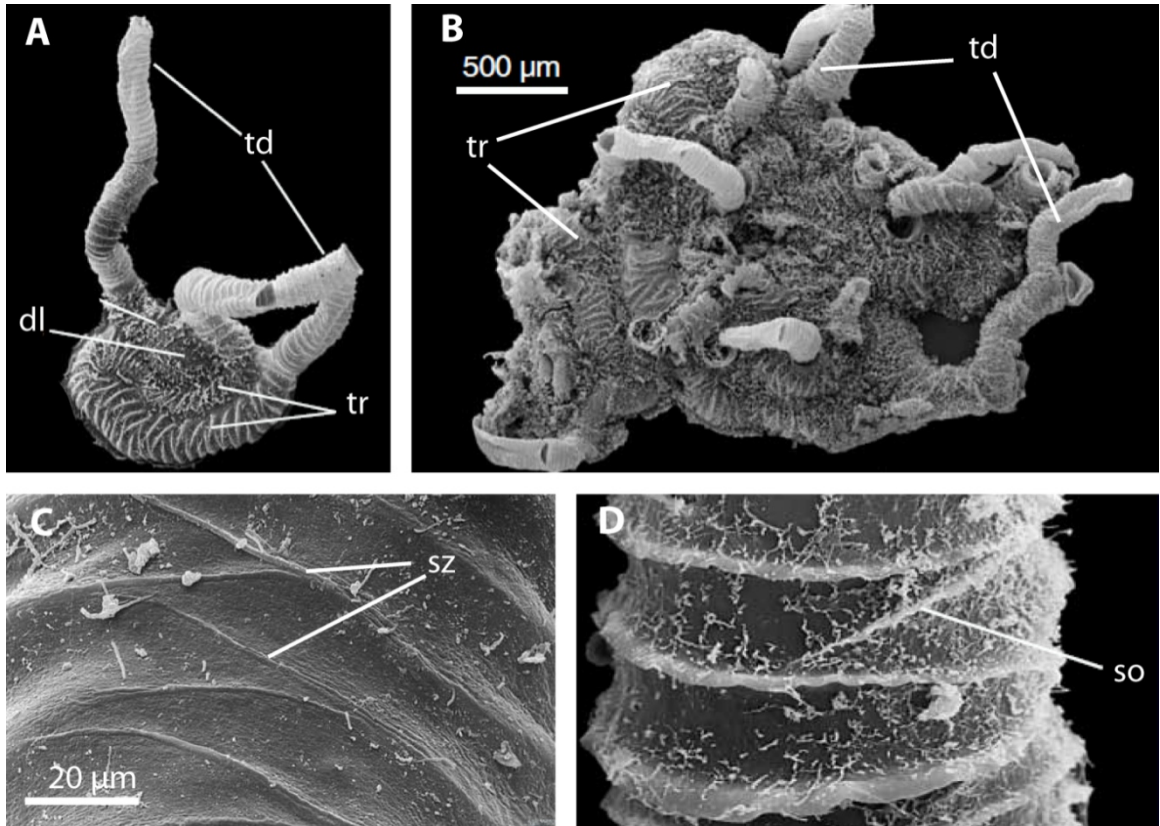


Figure 15. Coenecium de *Rhabdopleura compacta*. A, coenecium en début de formation avec dôme larvaire visible. B, coenecium mature. C, détail du tube rampant, montrant une suture en zig-zag. D, détail d'un tube droit, montrant une suture oblique. dl, dôme larvaire ; td, tube droit ; tr, tube rampant ; so, suture oblique ; sz, suture en zig-zag. *Modifié d'après Mierzejewski & Kulicki (2003).*

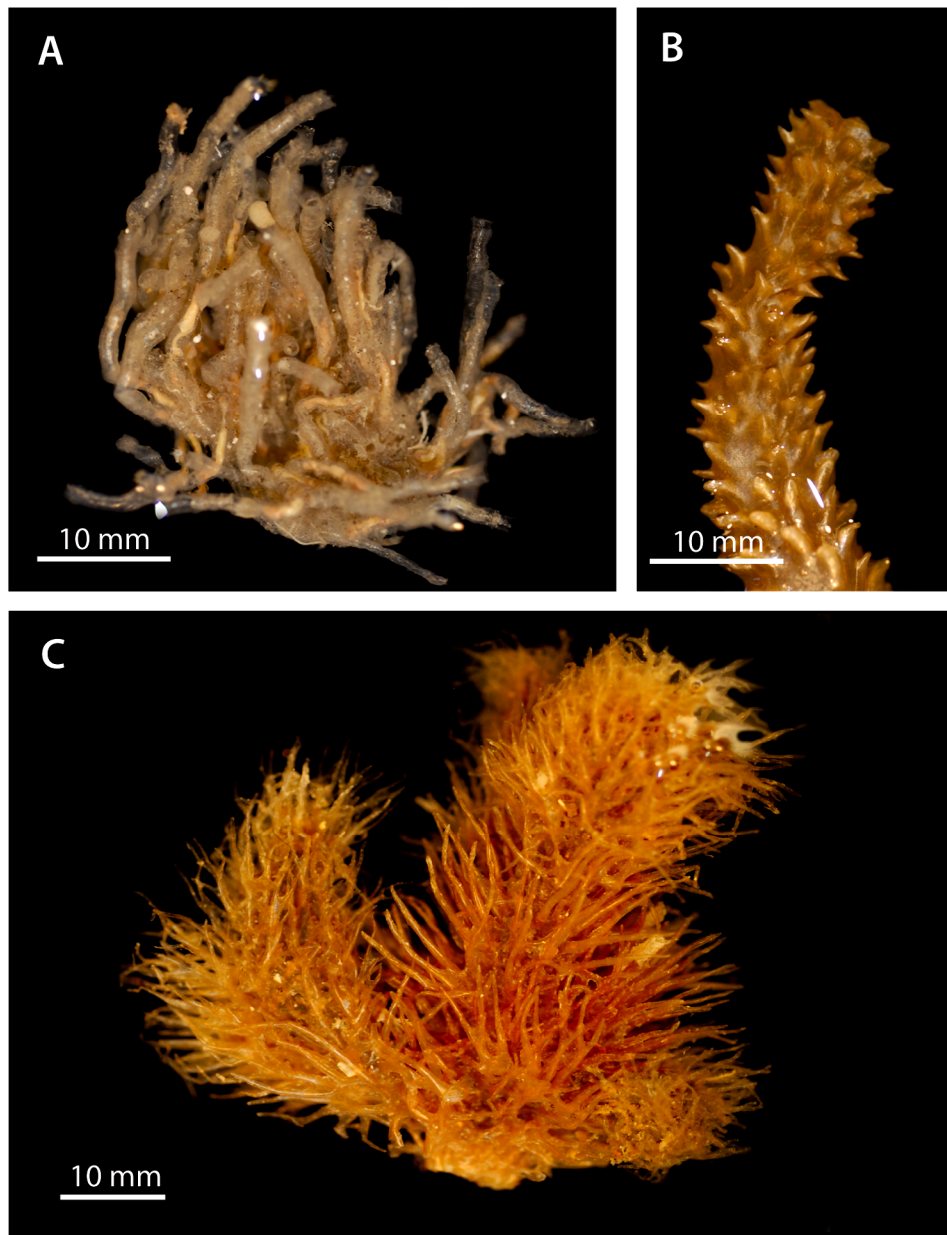


Figure 16. Diversity of coenecial morphology in *Cephalodiscus*. A, *Cephalodiscus (Orthoecus) densus*. B, *Cephalodiscus (Idiothecia) nigrescens*. C, *Cephalodiscus (Demiothecia) hodgsoni*.

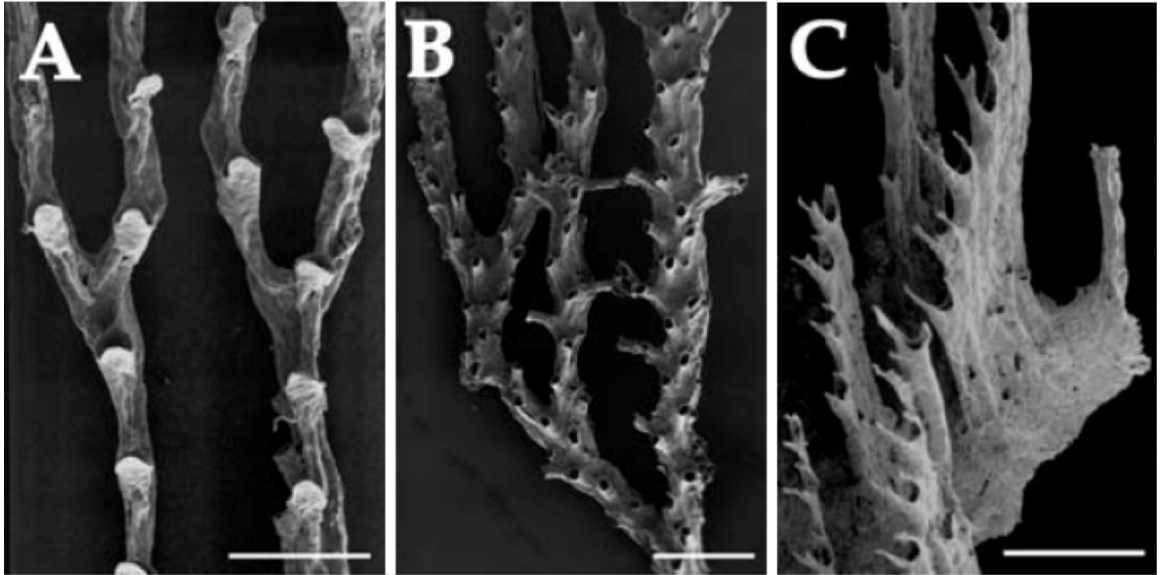


Figure 17. Rhabdosome de graptolithes benthiques (Dendroidea). A, *Dictyonema rarum*. B, *Acanthograptus musciformis*. C, *Discograptus schmidti*. Échelle: 1mm. Tiré de Sato et al. (2008).

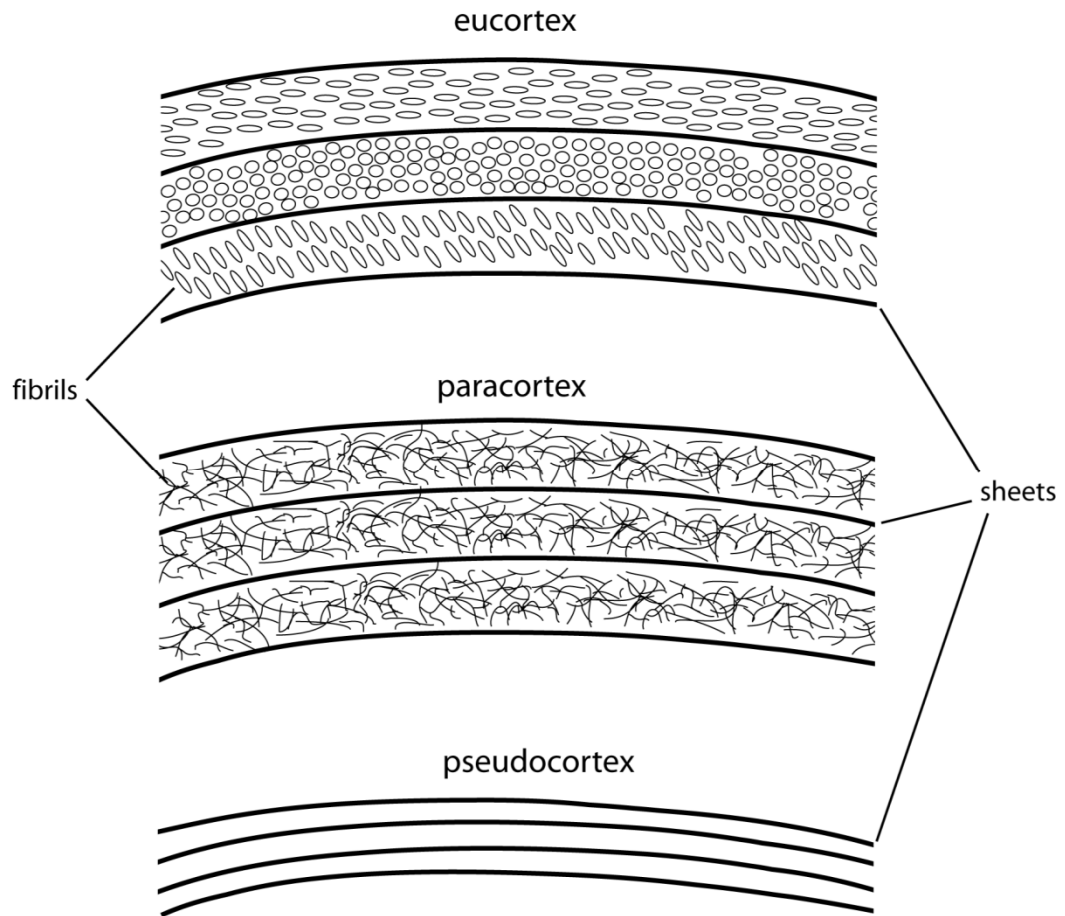


Figure 18. Schematic representation of three main types of cortical organization in the Pterobranchia. Eucortex is composed of layers of arranged cortical fibrils arranged in parallel and separated by sheets. Paracortex is composed of layers of randomly arranged non-cortical fibrils separated by sheets. Pseudocortex is formed by an accumulation of sheets enclosing spaces devoid of fibrils.

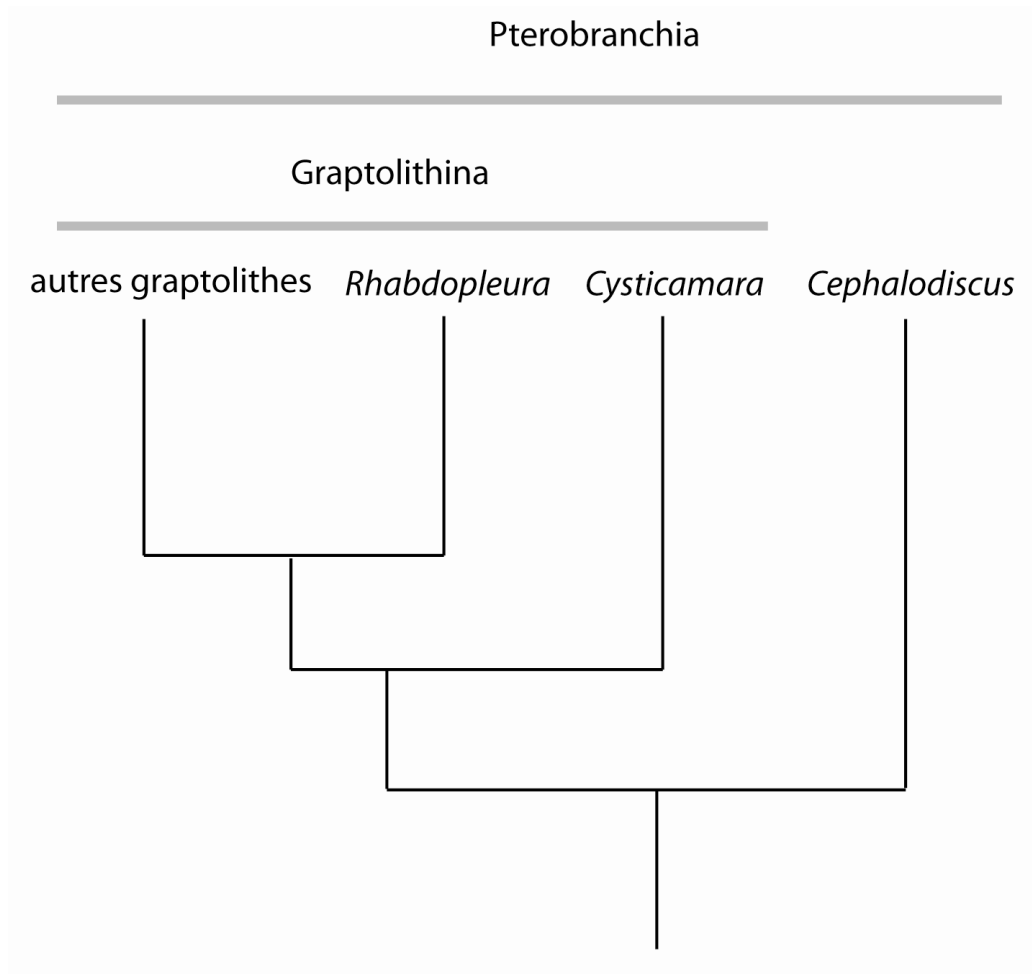


Figure 19. Arbre phylogénétique de la classe Pterobranchia. Pterobranchia regroupe les deux genres actuels *Cephalodiscus* et *Rhabdopleura*, ainsi que la totalité des graptolithes éteints. Le genre *Rhabdopleura* est le seul représentant actuel du taxon Graptolithina. *Cephalodiscus* est le groupe-frère de Graptolithina. Basé sur l'analyse cladistique de Melchin et al. (non publié).

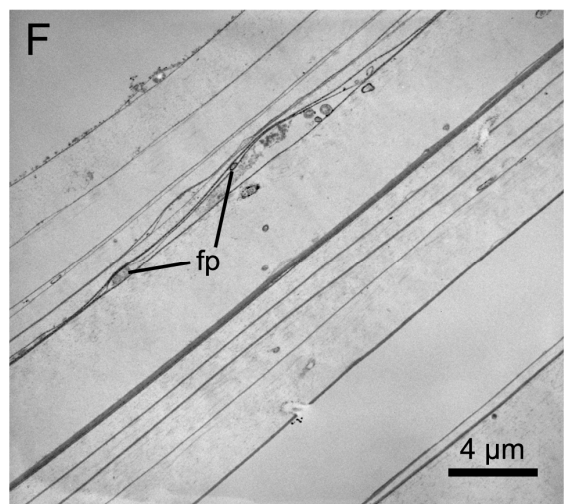
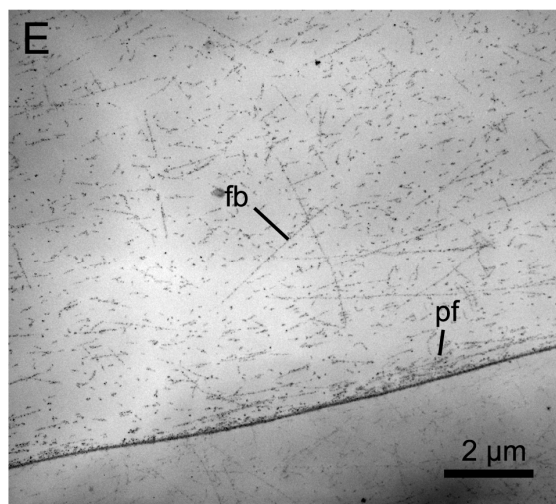
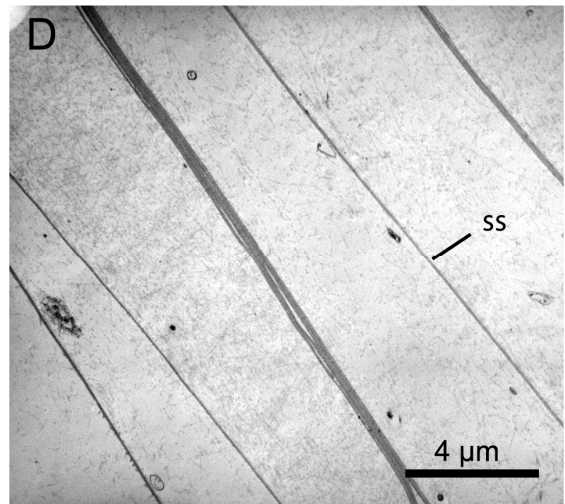
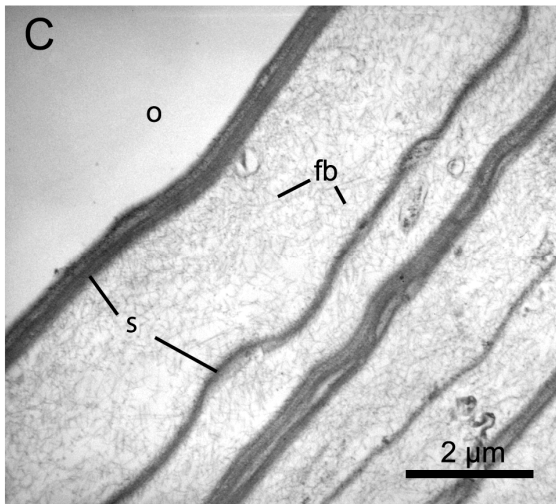
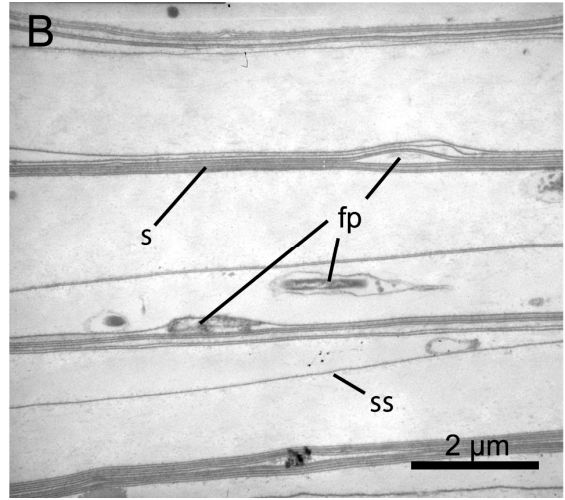
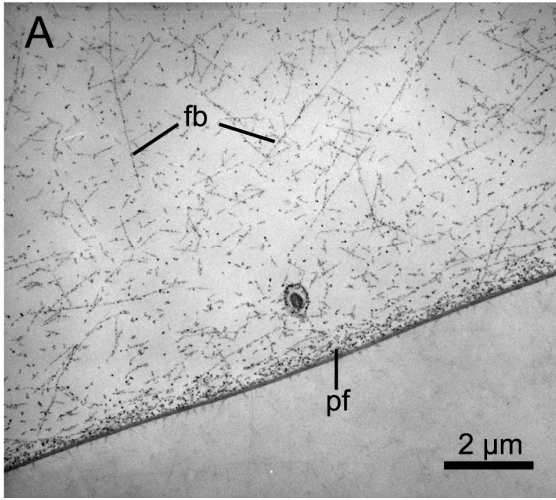


Figure 20. TEM micrographs of the coenecium of *Cephalodiscus hodgsoni* and *Cephalodiscus nigrescens*. A, B, transverse sections through the walls of the coenecium of *Cephalodiscus hodgsoni*. C, D, transverse sections through a spine of *C. hodgsoni*. E, F, transverse sections through the walls of the coenecium of *C. nigrescens*. fb, fibrils ; fp, foreign particles ; pf, parallel fibrils ; s, sheet ; ss, single sheet.

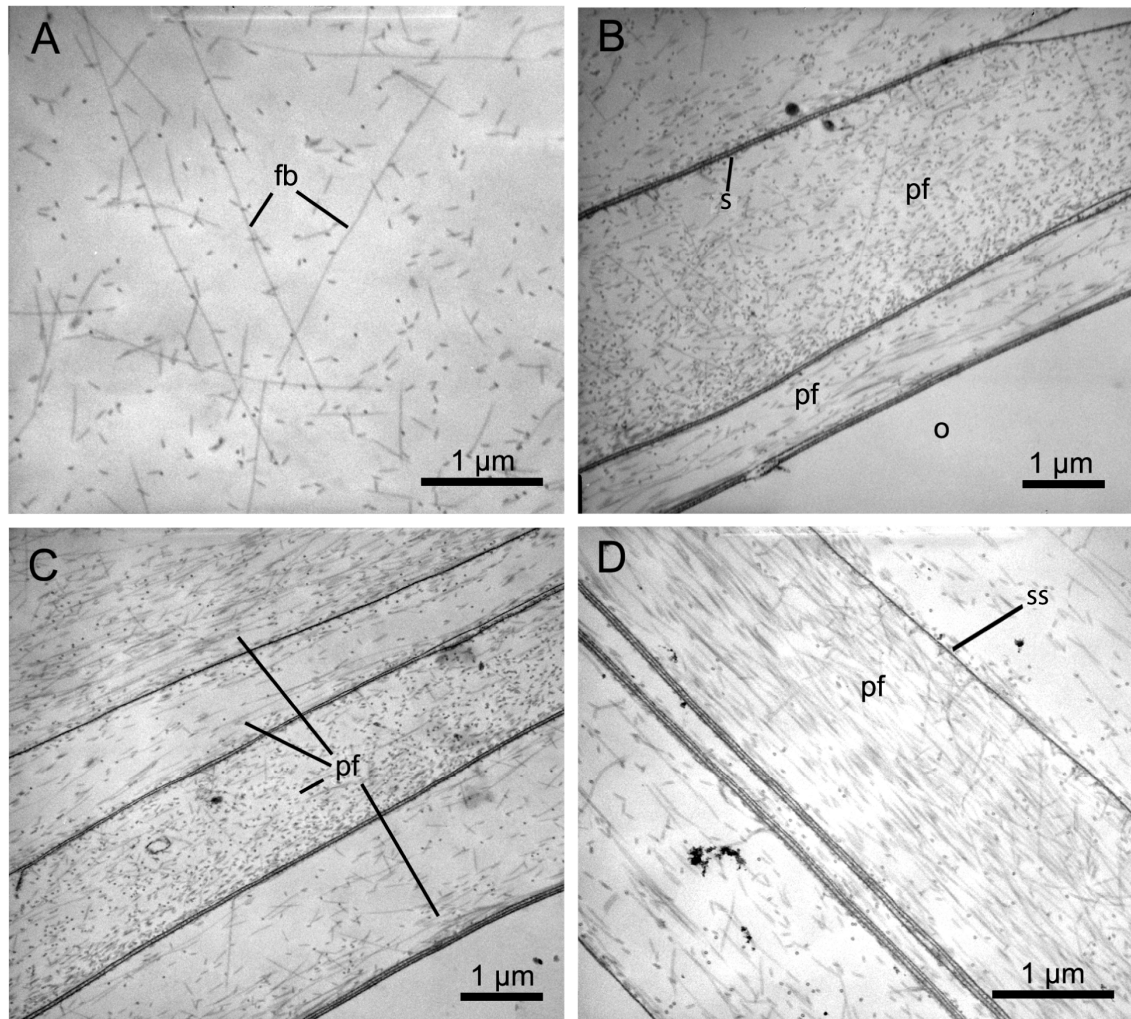


Figure 21. TEM micrographs of transverse sections through the walls of the coenecium of *Cephalodiscus densus*. A, randomly orientated fibrils. B, C, D, outer layers of the coenecium, showing a parallel arrangement of fibrils. fb, fibrils ; pf, parallel fibrils ; s, sheet ; ss, single sheet.

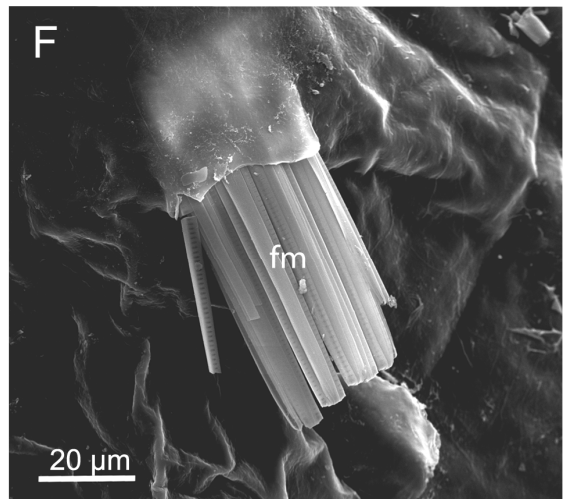
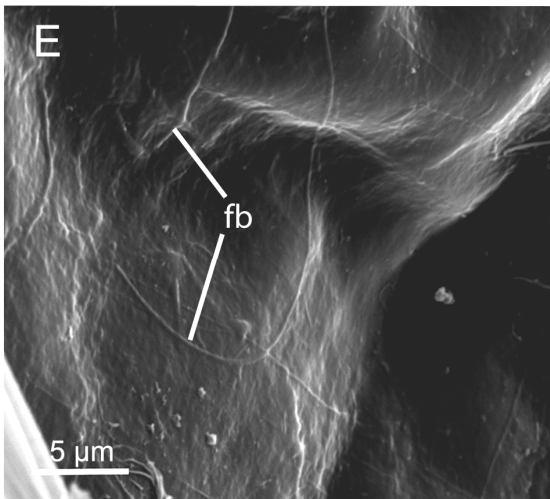
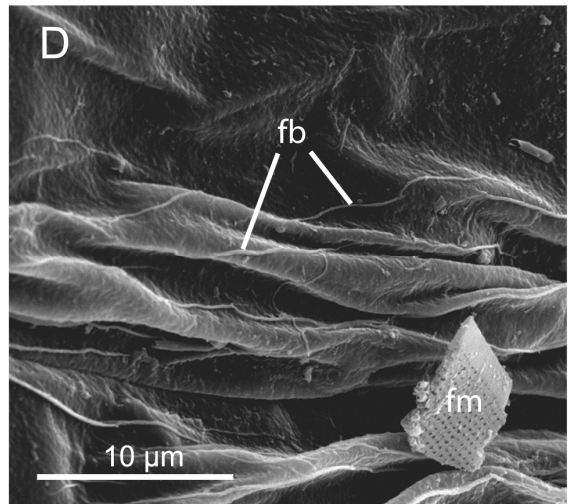
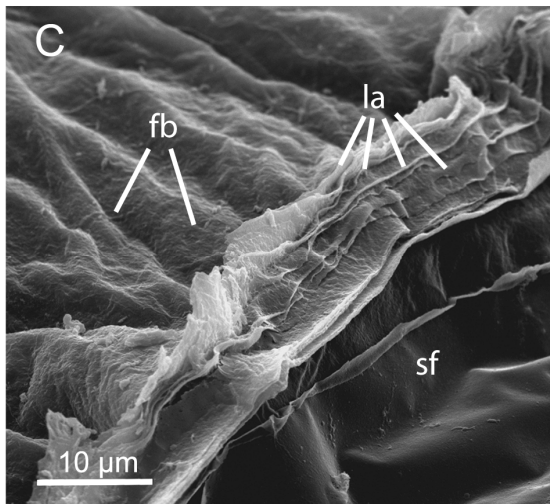
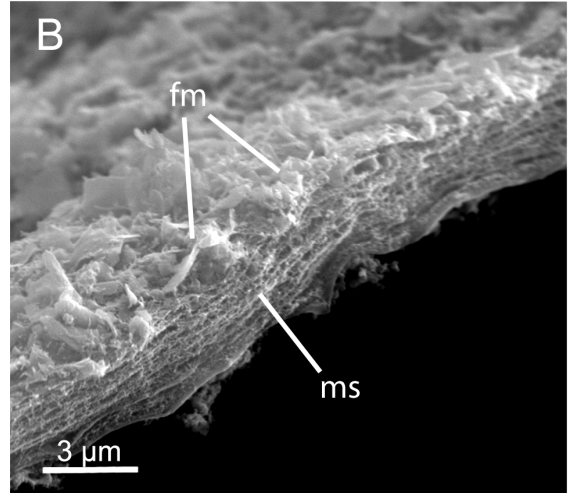
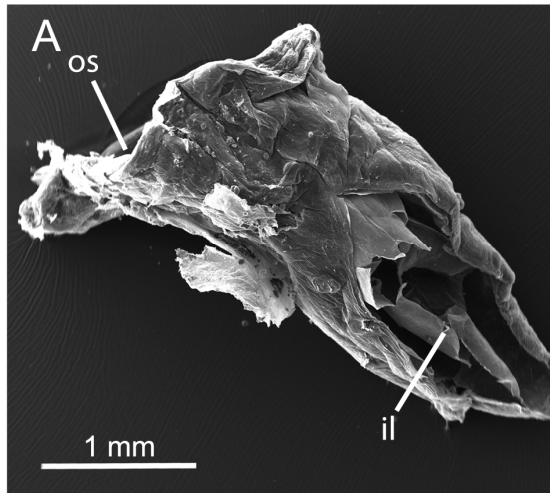


Figure 22. SEM micrographs of the coenecium of *Cephalodiscus*. A, individual tube of *C. nigrescens*. B, cross-section through layers of the wall of *C. nigrescens*. C, outer wall of the coenecium of *C. hodgsoni*, showing the layered organization of the coenecium. D, E, outer walls of the coenecium of *C. hodgsoni*, showing thick fibrils. F, outer wall of *C. hodgsoni*, showing the inclusion of foreign material between successive layers of the coenecium. fb, fibrils ; fm, foreign material ; il, inner layer ; la, layers ; os, ostium ; ms, meshwork of fibrils ; sf, sheet fabric.

RÉFÉRENCES

Abramoff MD, Magelhaes PG, Ram SJ. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11: 36–42.

Andersson K. 1907: Die Pterobranchier der schwedischen Sudpolar Expedition 1901–1903. *Wissenschaft Ergebnisse Schwedische Studpolar-Expedition* 5: 1–122.

Andres D. 1980. Feinstrukturen und Verwandtschaftsbeziehungen der Graptolithen. *Paläontologische Zeitschrift* 54: 129–170.

Armstrong WG, Dilly PN, Urbanek A. 1984. Collagen in the pterobranch coenecium and the problem of graptolite affinities. *Lethaia* 17: 145-152.

Aronowicz J, Lowe CJ. 2006. *Hox* gene expression in the hemichordate *Saccoglossus kowalevskii* and the evolution of deuterostome nervous systems. *Integrative and Comparative Biology* 46: 890-901.

Barrington EJW. 1940. Observations on feeding and digestion in *Glossobalanus minutus*. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 82: 227–260.

Bateson W. 1886. The ancestry of the Chordata. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 26: 535–571.

Bayer FM. 1962. A new species of *Cephalodiscus* (Hemichordata: Pterobranchia), the first record from the tropical Western Atlantic. *Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbeans* 12: 306-312.

- Blair JE, Hedges SB. 2005. Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals. *Molecular Biology and Evolution* 22: 2275-2284.
- Bone Q, Braconnot JC, Carré C, Ryan KP. 1997. On the filter-feeding of *Doliolum* (Tunicata: Thaliacea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 179: 179-193.
- Bone Q, Carré C, Chang P. 2003. Tunicate feeding filters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 83: 907-919.
- Bourlat SJ, Juliusdottir T, Lowe, CJ, Freeman R, Aronowicz J, Kirschner M, Lander ES, Thorndyke M, Nakano H, Kohn AB, Heyland A, Moroz LL, Copley RR, Telford MJ. 2006. Deuterostome phylogeny reveals monophyletic chordates and the new phylum Xenoturbellida. *Nature* 444: 85-88.
- Bourlat SJ, Nielsen C, Lockyer AE, Littlewood DTJ, Telford MJ. 2003. *Xenoturbella* is a deuterostome that eats molluscs. *Nature* 424: 925-928.
- Brambell FWR, Cole HA. 1939. The preoral ciliary organ of the Enteropneusta: its occurrence, structure and possible phylogenetic significance. *Proceedings of the Zoological Society of London* 109: 181-193.
- Bullock TH, Horridge GA. 1965. *Structure and function in the nervous systems of invertebrates*. Freeman WH (Ed.), San Francisco. 919 pp.
- Bulman OMB. 1970. Graptolithina, with sections on Enteropneusta and Pterobranchia. In Tiechert C (Ed.) *Treatise of Invertebrate Palaeontology Part V. (2nd ed)*: 1-32. Geological Society of America and University of Kansas press. 163 pp.

Burdon-Jones C. 1952. Development and biology of the larva of *Saccoglossus horsti* (Enteropneusta). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 236: 553–589.

Burdon-Jones C. 1956. Observations on the enteropneust, *Protoglossus koehleri* (Caullery and Mesnil). *Proceedings of the Zoological Society of London* 127: 35–58.

Burdon-Jones C. 1962. The feeding mechanism of *Balanoglossus gigas*. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo* 24: 255–280.

Burrows HL, Douglas KR, Seasholtz AF, Camper SA. 1999. Genealogy of the anterior pituitary gland: tracing a family tree. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 10: 343–352.

Byrne M, Fontaine AR. 1983. Morphology and function of the tube feet of *Florometra serratissima* (Echinodermata : Crinoidea). *Zoomorphology* 102: 175–187.

Cameron CB. 2002a. The anatomy, life habits, and later development of a new species of enteropneust, *Harrimania planktophilus* (Hemichordata: Harrimaniidae) from Barkley Sound. *Biological Bulletin* 202: 182–191.

Cameron CB. 2002b. Particle retention and flow in the pharynx of the enteropneust worm *Harrimania planktophilus*: the filter-feeding pharynx may have evolved before the chordates. *Biological Bulletin* 202: 192–200.

Cameron CB. 2005. A phylogeny of the hemichordates based on morphological characters. *Canadian Journal of Zoology* 83: 196–215.

Cameron CB, Garey JR, Swalla BJ. 2000. Evolution of the chordate body plan: new

insights from phylogenetic analyses of deuterostome phyla. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 4469–4474.

Cameron CB, Mackie GO, Powel JFF, Lescheid DW, Sherwood NM. 1999. Gonadotropin-Releasing Hormone in Mulberry cells of *Saccoglossus* and *Ptychodera* (Hemichordata: Enteropneusta). *General and Comparative Endocrinology* 114: 2-10.

Candiani S, Holland ND, Oliveri D, Parodi M, Pestarino M. 2008. Expression of the amphioxus Pit-1 gene (*AmphiPOU1F1/Pit-1*) exclusively in the developing preoral organ, a putative homolog of the vertebrate adenohypophysis. *Brain Research Bulletin* 75: 324–330.

Candiani S, Pestarino M. 1998. Expression of the tissue-specific transcription factor Pit-1 in the lancelet, *Branchiostoma lanceolatum*. *Journal of Comparative Neurology* 400: 310-316.

Carroll SB. 2008. Evo-Devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution. *Cell* 134: 25-36.

Chang CY, Chu Y, Chen D. 1982. Immunocytochemical demonstration of luteinizing hormone (LH) in Hatschek's pit of amphioxus (*Branchiostoma belcheri*). *Kexue Tongbao* 27: 1233-1234.

Crowther PR. 1978. The nature and mode of life of the graptolite zooid with reference to secretion of the cortex. *Acta Palaeontologica Polonica* 23: 474-479.

Davidson EH, Erwin DH. 2006. Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science* 311: 796-800.

- Deibel D. 1986. Feeding mechanism and house of the appendicularian *Oikopleura vanhoeffeni*. *Marine Biology* 93: 429-436.
- Delsman HC. 1922. *The Ancestry of Vertebrates as a Means of Understanding Their Principal Features of Their Structure and Development*. Valkoff, Amersfoort, Holland.
- Delsuc F, Tsagkogeorga G, Lartillot N, Philippe H. 2008. Additional molecular support for the new chordate phylogeny. *Genesis* 46: 592–604.
- Dilly PN. 1971. Keratin-like fibres in the hemichordate *Rhabdopleura compacta*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 117: 502-515.
- Dilly PN. 1975. The dormant buds of *Rhabdopleura compacta* (Hemichordata). *Cell and Tissue Research* 159: 387–397.
- Dilly PN. 1985a. The prosicular stage of *Rhabdopleura compacta* (Pterobranchia: Hemichordata). *Journal of the Zoological Society of London* 206: 163-174.
- Dilly PN. 1985b. The habitat and behaviour of *Cephalodiscus gracilis* (Pterobranchia, Hemichordata) from Bermuda. *Journal of Zoology* 207: 223-239.
- Dilly PN. 1986. Modern pterobranchs: observations on their behaviour and tube building. In Hughes CP & Rickards RB (Ed.), *Palaeoecology and Biostratigraphy of Graptolites*, *Geological Society Special Publication* 20: 261-269.
- Dilly PN. 1988. Tube building by *Cephalodiscus gracilis*. *Journal of Zoology* 216: 465-468.

Dilly PN. 1993. *Cephalodiscus graptolitoides* sp. nov. a probable extant graptolite. *Journal of Zoology* 229: 69-78.

Dominguez P, Jacobson AG, Jefferies RPS. 2002. Paired gill slits in a fossil with a calcite skeleton. *Nature* 417: 841–846.

Dunn CW, Hejnol A, Matus DQ, Pang K, Browne WE, Smith SA, Seaver E, Rouse GW, Obst M, Edgecombe GD, Sørensen MV, Haddock SHD, Schmidt-Rhaesa A, Okusu A, Kristensen RM, Wheeler WC, Martindale MQ, Giribet G. 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* 452: 745-750.

Emig CC. 1977. Sur une nouvelle espèce de *Cephalodiscus*, *C. (C.) caliciformis* n. sp. (Hemichordata, Pterobranchia), récoltée à Madagascar. *Bulletin du Museum National d'Histoire Naturelle 3^e série*, 493 : 1077-1082.

Engelbrecht D. 1969. The annelid ancestry of the chordates and the origin of the chordate central nervous system and the notochord. *Zeitschrift fuer Zoologische Systematik und Evolutionsforschung* 7:18-30.

Fang, YQ. 1993. Immunocytochemical localization of fish gonadotropin (GTH) in the brain vesicle and Hatschek's pit of Amphioxus. *Chinese Science Bulletin* 38: 1747-1751.

Fang YQ, Wang L. 1984. The preliminary study of homogenate of the wheel organ and Hatschek's pit of amphioxus on testicular development in young toad (*Bufo malanostictus*). *Acta Biologica Sinica* 17: 115.

Fang Y, Weng Y. 2006. Distribution of growth hormone-like immunoreactive cells and somatostatin receptors in the nervous system and Hatschek's pit of amphioxus, *Branchiostoma belcheri*. *Progress in Natural Science* 16: 359-365.

- Fang Y, Weng Y, Chen L. 2001. Effects of damage of Hatschek's pit of amphioxus on its structure and function. *Chinese Science Bulletin* 46: 1528-1533.
- Garstang W. 1928. The morphology of the Tunicata and its bearings on the phylogeny of the Chordata. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 72: 51-77.
- Gaskell WH. 1890. On the origin of vertebrates from a crustacean-like ancestor. *Quarterly Journal of Microscopical Sciences* 31: 379-444.
- Gerhart J. 2006. The deuterostome ancestor. *Journal of Cellular Physiology* 209: 677-685.
- Gilchrist JDF. 1915. Observations on the Cape *Cephalodiscus* (*C. gilchristi*, Ridewood) and some of its early stages. *The Annals and Magazine of Natural History (8th Series)* 16: 233-243.
- Gilchrist JDF. 1917. On the development of the Cape *Cephalodiscus* (*C. gilchristi*, Ridewood). *Quarterly Journal of Microscopical Science* 62: 118-211.
- Gilmour THJ. 1979. Feeding in pterobranch hemichordates and the evolution of gill slits. *Canadian Journal of Zoology* 57: 1136-1142.
- Goodrich FRS. 1917. 'Proboscis pores' in craniate vertebrates, a suggestion concerning the premandibular somites and hypophysis. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 62: 539-553.
- Gonzalez P, Cameron CB. 2009. The gill slits and pre-oral ciliary organ of *Protoglossus* (Hemichordata: Enteropneusta) are filter-feeding structures. *Biological Journal of the Linnean Society* 98: 898-906.

- Gorbman A. 1995. Olfactory origins and evolution of the brain-pituitary endocrine system: facts and speculation. *General and Comparative Endocrinology* 97: 171-178.
- Gorbman A, Nozaki M, Kubokawa K. 1999. A brain-Hatschek's pit connection in amphioxus. *General and Comparative Endocrinology* 113: 251-254.
- Gorbman A, Whiteley A, Kavanaugh S. 2003. Pheromonal stimulation of spawning release of gametes by gonadotropin releasing hormone in the chiton, *Mopalia* sp.. *General and Comparative Endocrinology* 131: 62-65.
- Halanych KM. 1993. Suspension feeding by the lophophore-like apparatus of the pterobranch hemichordate *Rhabdopleura normani*. *Biological Bulletin* 185: 417-427.
- Halanych KM. 1995. The phylogenetic position of the pterobranch hemichordates based on 18S rDNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4: 72-76.
- Halanych KM. 1996. Convergence in the feeding apparatuses of lophophorates and pterobranch hemichordates revealed by 18S rDNA: an interpretation. *Biological Bulletin* 190: 1-5.
- Halanych KM, Bacheller JD, Aguinaldo AM, Liva SM, Hillis DM, Lake JA. 1995. Evidence from 18S ribosomal DNA that the lophophorates are protostome animals. *Science* 267: 1641-1643.
- Harmer SF. 1905. The Pterobranchia of the Siboga expedition, with an account of other Species. *Résultat des Explorations à bord du Siboga, Livre 22, Monographie 26 bis*: 1-132.
- Harmer SF, Ridewood WG. 1913. The Pterobranchia of the Scottish national Antarctic expedition (1902-1904). *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 49: 531-565.

Hart MW. 1991. Particle captures and the method of suspension feeding by echinoderm larvae. *Biological Bulletin* 180: 12-27.

Helmkamp M, Bruchhaus I, Hausdorf B. 2008. Phylogenomic analyses of lophophorates (brachiopods, phoronids and bryozoans) confirm the Lophotrochozoa concept. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275: 1927-1933.

Holland ND, Holland LZ, Kozmik Z. 1995. An amphioxus *Pax* gene, *AmphiPax-1*, expressed in embryonic endoderm, but not in mesoderm: implications for evolution of class 1 paired box genes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 4: 206-214.

Holland LZ, Holland ND. 1996. Expression of *AmphiHox-1* and *AmphiPax-1* in amphioxus embryos treated with retinoic acid: insights into evolution and patterning of the chordate nerve cord and pharynx. *Development* 122: 1829-1838.

Holland ND, Strickler JR, Leonard AB. 1986. Particle interception, transport and rejection by the feather star *Oligometra serripina* (Echinodermata: Crinoidea), studied by frame analysis of videotapes. *Marine Biology* 93: 111-126.

Holland ND, Venkatesh TV, Holland LZ, Jacobs DK, Bodmer R. 2003. *AmphiNk2-tin*, an amphioxus homeobox gene expressed in myocardial progenitors: insights into the evolution of the vertebrate heart. *Developmental Biology* 255: 128-137.

Hulmes DJS. 2002. Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *Journal of Structural Biology* 137: 2-10.

Hyman LH. 1959. *The invertebrates: smaller coelomate groups*. McGraw-Hill, New York.

Jefferies RPS. 1986. *The ancestry of the vertebrates*. London: British Museum (Natural History).

Jefferies RPS, Brown NA, Daley PEJ. 1996. The early phylogeny of chordates and echinoderms and the origin of chordate left-right asymmetry and bilateral symmetry. *Acta Zoologica* 77: 101–122.

Jensen DD. 1988. Hubrecht, Macfarlane, Jensen, and Willmer: on the nature and testability of four versions of the nemertean theory of vertebrate origins. *Hydrobiologia* 156: 99–104.

John CC. 1931. *Cephalodiscus*. *Discovery Reports* 3: 223-260.

John CC. 1932. On the development of *Cephalodiscus*. *Cambridge Discovery Reports* 6: 191-204.

Johnston TH, Muirhead NG. 1951. *Cephalodiscus*. *Reports BANZ Antarctic Research Expedition (B)* 1: 91-120.

Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. 1996. Collagen fibril formation. *Biochemical Journal* 316: 1-11.

Kardong KV. 2002. *Vertebrates: comparative anatomy, function, evolution*. 3rd edition. McGraw Hill, Boston.

Knight-Jones EW. 1953. Feeding in *Saccoglossus* (Enteropneusta). *Proceedings of the Zoological Society of London* 123: 637–658.

- Komai MJA. 1949. Internal structure of the pterobranch *Atubaria heterolopha* Sato, with an appendix on the homology of the 'notochord'. *Proceedings of the Japan academy* 25: 19-24.
- Kozłowski R. 1938. Informations préliminaires sur les graptolites du Trémadoc de la Pologne et leur portée théorique. *Annales Musei Zoologici Polonici* 13: 183-196.
- Kozłowski R. 1947. Les affinités des graptolithes. *Biological reviews* 92: 93-108.
- Kozłowski R. 1949. Les graptolithes et quelques nouveaux groupes d'animaux du Trémadoc de la Pologne. *Palaeontologica Polonica* 3: 1-235.
- Kozłowski R. 1966. On the structure and relationships of graptolites. *Journal of Palaeontology* 40: 489-501.
- Kozłowski R. 1971. Early development stages and mode of life of graptolites. *Acta Palaeontologica Polonica* 16: 313-343.
- Krieger J, Breer H. 1999. Olfactory reception in invertebrates. *Science* 286: 720-723.
- Lacalli TC, West JE. 1993. A distinctive nerve cell type common to diverse deuterostome larvae: comparative data from echinoderms, hemichordates and amphioxus. *Acta Zoologica* 74: 1-8.
- Lacalli TC, Gilmour THJ. 2001. Locomotory and feeding effectors of the tornaria larva of *Balanoglossus biminiensis*. *Acta Zoologica* 82:117-126.
- Lankester ER. 1905. On a new species of *Cephalodiscus* (*C. nigrescens*) from the Antarctic ocean. *Proceedings of the Royal Society of London* 76: 400-402.

- Lester SM. 1985. *Cephalodiscus* sp. (Hemichordata: Pterobranchia): observations of functional morphology, behavior and occurrence in shallow water around Bermuda. *Marine Biology* 85: 263-268.
- Long S, Byrne M. 2001. Evolution of the echinoderm Hox gene cluster. *Evolution and Development* 3: 302-311.
- Løvtrup S. 1977. The phylogeny of the Vertebrata. Wyley, London.
- Lowe CJ, Wu M, Salic A, Evans L, Lander E, Stange-Thomann N, Gruber CE, Gerhart J, Kirschner M. 2003. Anteroposterior patterning in hemichordates and the origins of the chordate nervous system. *Cell* 113: 853–865.
- Lowe CJ, Terasaki M, Wu M, Freeman RM, Runft L, Kwan K, Haigo S, Aronowicz J, Lander E, Gruber C, Smith M, Kirschner M, Gerhart J. 2006. Dorsoventral patterning in hemichordates: insights into early chordate evolution. *PLoS Biology* 4: 1603–1619.
- MacGinitie GE. 1993. The method of feeding of tunicates. *Biological Bulletin* 77:443-447.
- Mallatt J. 1982. Pumping rates and particle retention efficiencies of the larval lamprey, an unusual suspension feeder. *Biological Bulletin* 163: 197–210.
- Markham JC. 1971. The species of *Cephalodiscus* collected during operation Deep Freeze, 1956-1959. *Antarctic Research Series* 17: 83-110.
- Melchin, MJ, Cameron, CB, Mitchell, CE, and Maletz, J. (in review) Phylogeny of the Tube-Building Hemichordata Reveals that *Rhabdopleura* is an Extant Graptolite. *PLoS One*.

- Mierzejewski P, Kulicki C. 2001. Graptolite-like fibril pattern in the fusellar tissue of Palaeozoic rhabdopleurid pterobranchs. *Acta Palaeontologica Polonica* 46: 349-366.
- Mierzejewski P, Kulicki C. 2003. Cortical fibrils and secondary deposits in periderm of the hemichordate *Rhabdopleura* (Graptolithoidea). *Acta Palaeontologica Polonica* 48: 99-111.
- Neubuser A, Koseki H, Balling R. 1995. Characterization and developmental expression of Pax9, a paired-box containing gene related to Pax1. *Developmental Biology* 170: 701–716.
- Nica G, Herzog W, Sonntag C, Hammerschmidt M. 2004. Zebrafish *pit1* mutants lack three pituitary cell types and develop severe dwarfism. *Molecular Endocrinology* 18: 1196-1209.
- Nielsen C. 1999. Origin of the chordate central nervous system – and the origin of chordates. *Development Genes and Evolution* 209: 198–205.
- Nielsen SE, Bone Q, Bond P, Harper G. 2007. On particle filtration by amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 87: 983-989.
- Nielsen C, Hay-Schmidt A. 2007. Development of the enteropneust *Ptychodera flava*: ciliary bands and nervous system. *Journal of Morphology* 268: 551–570.
- Nozaki M, Gorbman, A. 1992. The question of functional homology of Hatschek's pit of amphioxus (*Branchiostoma belcheri*) and the vertebrate adenohypophysis. *Zoological Science* 9: 387-395.
- Ogasawara M. 2000. Overlapping expression of amphioxus homologs of the thyroid transcription factor-1 gene and thyroid peroxidase gene in the endostyle: insight into evolution of the thyroid gland. *Development Genes and Evolution* 210: 231-242.

- Ogasawara M, Wada H, Peters H, Satoh N. 1999. Developmental expression of Pax1/9 genes in urochordate and hemichordate gills: insight into function and evolution of the pharyngeal epithelium. *Development* 126: 2539–2550.
- Okai N, Tagawa K, Humphreys T, Satoh N, Ogasawara M. 2000. Characterization of gill-specific genes of the acorn worm *Ptychodera flava*. *Developmental Dynamics* 217: 309–319.
- Orton JH. 1913. The ciliary mechanisms of the gill and the mode of feeding in amphioxus, ascidians, and *Solemya togata*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 10: 506–512.
- Pardos F. 1988. Fine structure and function of pharynx cilia in *Glossobalanus minutus* Kowalewsky (Enteropneusta). *Acta Zoologica* 69: 1–12.
- Pardos F, Benito J. 1988. Blood vessels and related structures in the gill bars of *Glossobalanus minutus* (Enteropneusta). *Acta Zoologica* 69: 87–94.
- Patten W. 1890. On the origin of vertebrates from arachnids. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 31: 317–378.
- Petersen JK. 2007. Ascidian suspension feeding. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 342: 127–137.
- Philippe H, Lartillot N, Brinkmann H. 2005. Multigene analyses of bilaterian animals corroborate the monophyly of Ecdysozoa, Lophotrochozoa, and Protostomia. *Molecular Biology and Evolution* 22: 1246–1235.
- Putnam NH, Butts T, Ferrier DEK, Furlong RF, Hellsten U, Kawashima T, Robinson-

Rechavi M, Shoguchi E, Terry A, Yu JK, Benito-Gutierrez E, Dubchak I, Garcia-Fernandez J, Gibson-Brown JJ, Grigoriev IV, Horton AC, de Jong PJ, Jurka J, Kapitonov VV, Kohara Y, Kuroki Y, Lindquist E, Lucas S, Osoegawa K, Pennacchio LA, Salamov AA, Satou Y, Sauka-Spengler T, Schmutz J, Shin-IT, Toyoda A, Bronner-Fraser M, Fujiyama A, Holland LZ, Holland PWH, Satoh N, Rokhsar DS. 2008. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* 453: 1064–1063.

Raw F. 1960. Outline of a theory of origin of the Vertebrata. *Journal of Paleontology* 34: 497-539.

Rickards RB, Durman PN. 2006. Evolution of the earliest graptolites and other hemichordates. In Bassett M.G. and Deisler V.K. (Eds.). *Studies in Palaeozoic palaeontology. National Museum of Wales Geological Series No. 25*: 5-92, Cardiff.

Ridewood WG. 1906. A new species of *Cephalodiscus* (*C. gilchristi*) from the Cape seas. *Marine Investigations, South Africa* 4: 173-192.

Ridewood WG. 1907. Pterobranchia: *Cephalodiscus*. National Antarctic expedition ('Discovery'). *Natural History* 2: 1-67.

Ridewood WG. 1918a. *Cephalodiscus*. in *Natural History Reports of the British Antarctic 'Terra Nova' Expedition, 1910, Zoology*. 4: 11-82.

Ridewood WG. 1918b. Pterobranchia. In *Scientific Reports of the Australasian Antarctic Expedition, 1911-1914, Series C*. 3: 1-25.

Ridewood WG. 1920. A key for the ready identification of the species of *Cephalodiscus*. *Annals and Magazine of Natural History, London 5 Series* 9: 407-410.

Riisgård HU, Larsen PS. 1995. Filter-feeding in marine macro-invertebrates: pump characteristics, modeling and energy cost. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 70: 67-106.

Riisgård HU, Larsen PS. 2000. Comparative ecophysiology of active zoobenthic filter feeding, essence of current knowledge. *Journal of Sea Research* 44: 169–193.

Riisgård HU, Svane I. 1999. Filter feeding in lancelets (amphioxus), *Branchiostoma lanceolatum*. *Invertebrate biology* 118: 423-432.

Romer AS. 1967. Major steps in vertebrate evolution. *Science* 158: 1629–1637.

Rosenfeld MG. 1991. POU-domain transcription factors: pou-er-ful developmental regulators. *Genes and Development* 5: 897-907.

Ruppert EE. 2005. Key characters uniting hemichordates and chordates: homologies or homoplasies? *Canadian Journal of Zoology* 83: 8-23.

Ruppert EE, Cameron CB, Frick JE. 1999. Endostyle-like features of the dorsal epibranchial ridge of an enteropneust and the hypothesis of dorsal–ventral axis inversion in chordates. *Invertebrate Biology* 118: 202–212.

Ruppert EE, Nash TR, Smith AJ. 2000. The size range of suspended particles trapped and ingested by the filter-feeding lancelet *Branchiostoma floridae* (Cephalochordata: Acrania). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 80: 329–332.

Ruppert EE, Fox RS, Barnes RD. 2004. *Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach, 7th ed.* Thomas Brooks/Cole, Belmont, CA.

- Rychel AL, Smith SE, Shimamoto HT, Swalla BF. 2006. Evolution and development of the chordates: collagen and pharyngeal cartilage. *Molecular Biology and Evolution* 23: 541–549.
- Rychel AL, Swalla BJ. 2007. Development and evolution of chordate cartilage. *Journal of experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 308: 325-335.
- Sahlin K, Olsson R. 1986. The wheel organ and Hatschek's groove in the lancelet, *Branchiostoma lanceolatum* (Cephalochordata). *Acta Zoologica* 67: 201–209.
- Sato A, Rickards B, Holland WH. 2008. The origin of graptolites and other pterobranchs, a journey from “Polyzoa”. *Lethaia* 41: 303-316.
- Sato A, White-Cooper H, Doggett K, Holland PWH. 2009. Degenerate evolution of the *hedgehog* gene in a hemichordate lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 7491-7494.
- Scully KM, Rosenfeld MG. 2002. Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science* 295: 2231-2235.
- Shu DG, Morris SC, Han J, Chen L, Zhang XL, Zhang ZF, Liu HQ, Li Y, Liu JN. 2001. Primitive deuterostomes from the Chengjiang Lagerstätte (Lower Cambrian, China). *Nature* 414: 419–424.
- Shubin N, Tabin C, Carroll S. 2009. Deep homology and the origins of evolutionary novelty. *Nature* 457: 818-823.
- Stebbing ARD. 1970. Aspects of the reproduction and life cycle of *Rhabdopleura compacta* (Hemichordata). *Marine Biology* 5: 205-212.

Takacs CM, Moy VN, Peterson KJ. 2002. Testing putative homologues of the chordate dorsal nervous system and endostyle: expression of *NK2.1 (TTF-1)* in the acorn worm *Ptychodera flava* (Hemichordata, Ptychoderidae). *Evolution and Development* 4: 405-417.

Telford MJ. 2008. Xenoturbellida: the fourth deuterostome phylum and the diet of worms. *Genesis* 45: 580–586.

Thomas IM. 1972. Action of the gut in *Saccoglossus otagoensis* (Hemichordata: Enteropneusta). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 6: 560–569.

Tjoa LT, Welsch U. 1974. Electron Microscopical observations on Kölliker's pit and Hatschek's pit and on the wheel organ in the head region of *Amphioxus (Branchiostoma lanceolatum)*. *Cell and Tissue Research* 153: 175-187.

Towe KM, Urbanek A. 1972. Collagen-like structure in Ordovician graptolite periderm. *Nature* 237: 443–445.

Turbeville JM, Schulz JR, Raff RA. 1994. Deuterostome phylogeny and the sister group of the chordates: evidence from molecules and morphology. *Molecular Biology and Evolution* 11: 648-655.

Urbanek A. 1976. The problem of graptolite affinities in the light of ultrastructural studies on peridermal derivatives in pterobranchs. *Acta Palaeontologica Polonica* 21: 3-36.

Urbanek A. 1986. The enigma of graptolite ancestry: lesson from a phylogenetic debate. In: A. Hoffman and M.H. Nitecki (Eds.), *Problematic Fossil Taxa*: 184–225. Oxford University Press, New York.

Urbanek A, Dilly PN. 2000. The stolon system in *Rhabdopleura compacta* (Hemichordata) and its phylogenetic implications. *Acta Palaeontologica Polonica* 45: 201-226.

Urbanek A, Mierzejewski P. 1984. The ultrastructure of the Crustoidea and the evolution of graptolite skeletal tissues. *Lethaia* 17: 73-91.

Urbanek A, Towe KM. 1974. Ultrastructural studies on graptolites, 1: the periderm and its derivatives in the Dendroidea and in *Mastigograptus*. *Smithsonian Contributions to Paleobiology* 20: 1-48.

Vogel S. 1994. *Life in moving fluids, the physical biology of flow*. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Wada H, Satoh N. 1994. Phylogenetic relationships among extant classes of echinoderms, as inferred from sequences of 18S rDNA, coincide with relationships deduced from the fossil record. *Journal of Molecular Evolution* 38: 41-49.

Welsch VLT, Welsch U. 1978. Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der präoralen Wimpergrube von *Saccoglossus horsti* (Hemichordata) und der Hatschekschen Grube von *Branchiostoma lanceolatum* (Acrania). Ein Beitrag zur phylogenetischen Entwicklung der Adenohypophyse. *Zoologische Jahrbucher Abteilung fur Anatomie und Ontogenie der Tiere* 100: 564-578.

Winchell CJ, Sullivan J, Cameron CB, Swalla BJ, Mallatt J. 2002. Evaluating hypotheses of deuterostome phylogeny and chordate evolution with new LSU and SSU ribosomal DNA data. *Molecular Biology and Evolution* 19: 762-776.

Zhang Z, Liu Y, Zhu Y, Zhu H. 1984. The reproductive endocrinology of *Amphioxus*. In: *Frontiers in physiological research*: 79-86. Australian Academy of Science, Canberra.

