







Université du Québec  
à Rimouski

**Ontogénie de la régionalisation de la colonne vertébrale de  
l'aiguillat noir (*Centrocyllium fabricii*)**

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en gestion de la faune et de ses habitats  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences

PAR

© MARGOT ANGIBAUD

Février 2020



**Composition du jury :**

**[Luc Sirois], président du jury, [Université du Québec à Rimouski]**

**[Richard Cloutier], directeur de recherche, [Université du Québec à Rimouski]**

**[Thomas Grünbaum], examinateur externe, [non affilié à une université]**

Dépôt initial le 12 août 2019

Dépôt final Février 2020



UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI  
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.





Je dédicace ce mémoire à mon frère Yoann Angibaud parce que je le peux mais surtout parce qu'il est incroyable.



## REMERCIEMENT

Ce mémoire n'aurait pas vu l'existence sans l'aide d'organisations et de personnes précieuses. Premièrement, je souhaite remercier l'Institut Maurice Lamontagne qui réalise des inventaires annuels et par la même occasion récupère les spécimens de requins et de raies que nous étudions. Deuxièmement, je remercie Cyrena Riley, qui, avec sa passion, m'a donnée envie de venir à l'Université du Québec à Rimouski mais surtout qui est la personne responsable de cette belle association entre le Laboratoire de recherche en paléontologie et biologie évolutive et l'Institut Maurice Lamontagne. Troisièmement, je remercie mes collègues de laboratoire : Vincent Roy, Roxane Noël, Cynthia Deschênes, Olivia Vanhaesebroucke, Richard Flament, Laurent Houle et Marie Boirot pour me montrer que l'été l'université n'est pas si vide que ça et pour profiter de la chaleur « Auriculairienne » avec moi. Quatrièmement, je souhaite remercier, Loick Ode, un ami et informaticien qui m'a aidé dans la manipulation de mes données. Cinquièmement, je remercie Alain Caron pour être une personne incroyable mais aussi pour sa générosité en connaissance statistique lorsque je n'avançais plus. Sixièmement, je remercie mon jury : Luc Sirois, Thomas Grünbaum et Richard Cloutier d'avoir effectué des commentaires productifs pour l'amélioration de ce mémoire. Ces remerciements sont accentués pour Richard Cloutier, mon directeur de maîtrise. Finalement, je remercie l'Université du Québec à Rimouski pour m'avoir donné la chance de vivre cette belle expérience !



## RESUME

Le squelette axial (la colonne vertébrale et les côtes) joue un rôle structural et fonctionnel important dans l'évolution des vertébrés. La colonne vertébrale est une succession de vertèbres qui sont cartilagineuses, minéralisées ou ossifiées et des ligaments entourant la notochorde. Des similarités anatomiques entre les vertèbres définissent des régions ou domaines (e.g., occipitale, cervicale, thoracique, lombaire, sacrale, précaudale, caudale) le long de l'axe antéro-postérieur du corps des vertébrés. La présence de cinq régions (i.e., cervicale, thoracique, lombaire, sacrale et caudale) a premièrement été reconnue chez des tétrapodes, puis par la suite chez des ostéichthyens basaux. En comparaison, le groupe des chondrichthyens a reçu peu d'attention sur le sujet considérant son importance phylogénétique. Cent-dix spécimens d'Aiguillat noir, *Centroscyllium fabricii*, mesurant entre 2,9 et 28,2 cm en longueur totale, ont été colorés afin de caractériser l'ontogénie de la régionalisation de la colonne vertébrale. Des différences morphologiques aux niveaux qualitatifs et quantitatifs ont été trouvées au sein des segments vertébraux, durant l'ontogénie, formant cinq régions anatomiques et développementales. Des anomalies morphologiques (e.g., fusion des arcs hémaux, addition d'un arc neural) ont été trouvées le long de l'axe antéro-postérieur. Elles ne semblent pas dispersées aléatoirement. Ces anomalies sont principalement retrouvées aux niveaux des zones de transition entre des régions axiales adjacentes et aux niveaux des structures distales. La région de transition entre les régions thoracique et sacrale présente la majorité des anomalies. Les régions de transition semblent correspondre topographiquement au chevauchement trouvé pour l'expression des gènes *Hox* chez *Scyliorhinus canicula*. La présence de cinq régions axiales, d'un point de vue anatomiques et développementales, est certainement une nouveauté des gnathostomes plus qu'une synapomorphie des ostéichthyens.

Mots clés : développement, évolution, colonne vertébrale, modularité, transition, *Hox*, anomalie, Chondrichthyes



## ABSTRACT

For more than a century, the axial skeleton (vertebral column and ribs) has been recognized to play an important structural role during vertebrate evolution. The vertebral column consists of serial vertebrae that are cartilaginous, mineralized or ossified, and ligamentous elements around the notochord. Anatomical similarities among vertebrae define vertebral regions or domains (e.g., occipital, cervical, thoracic, lumbar, sacral, precaudal, caudal) along the anteroposterior axis of the body. The presence of five axial regions (i.e., cervical, thoracic, lumbar, sacral, caudal) was first recognized in tetrapods, and subsequently reported in basal osteichthyans. However, the condition for chondrichthyans is poorly known. We cleared and double stained 110 specimens of Black dogfish, *Centroscyllium fabricii*, ranging from 2.9 to 28.2 cm in total length, to characterize regionalization pattern of the vertebral column. Qualitative and quantitative morphological differences were found among vertebral segments along the body axis, and during ontogeny, forming five distinct anatomical and developmental regions. Morphological anomalies (e.g., fusion of hemal arches, addition of neural arch) are found along the anteroposterior body axis. They are not randomly distributed, being mainly found in transitional zones delimiting each region and on distal structures such as arches; primarily between the thoracic and sacral regions. Transitional zones seem to match the overlap areas reported for *Hox* genes expression in *Scyliorhinus canicula*. The presence of five anatomical and developmental axial regions is most likely a gnathostome novelty than an osteichthyan synapomorphy.

*Keywords:* development, evolution, spine, modularity, transition zone, *Hox*, abnormalities, Chondrichthyes.





## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENT .....	ix
RESUME .....	xi
ABSTRACT.....	xiii
TABLE DES MATIERES.....	xv
LISTE DES FIGURES .....	xvii
LISTE DES TABLEAUX .....	xx
LISTE DES ABREVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	xxii
INTRODUCTION GENERALE .....	25
LA COLONNE VERTEBRALE .....	26
LA REGIONALISATION.....	29
LES ANOMALIES.....	35
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES.....	35
CHAPITRE 1 SHARK VERTEBRAL COLUMN: REGIONALISATION, ANOMALIES AND CRITICAL STAGES.....	38
1.1 INTRODUCTION .....	38
1.2 MATERIAL AND METHODS.....	41
Specimens .....	41
Clearing and staining of specimens .....	41
Statistical analyses .....	42
Terminology.....	44
1.3 RESULTS .....	45
Relation between total number of vertebra and total length .....	45

Chondrification of vertebral elements .....	45
Regionalization during ontogeny.....	49
Developmental anomalies.....	53
Identification of critical stages .....	55
1.4 DISCUSSION.....	56
Relation between the total number of vertebrae and total length.....	57
Vertebral column patterning.....	58
Developmental anomalies.....	59
<i>Hox</i> genes .....	61
Modularity .....	63
Identification of critical stages .....	64
1.5 CONCLUSION .....	66
CONCLUSION GENERALE.....	67
ORIGINALITE DE L'ETUDE .....	68
LIMITES DE L'ETUDE .....	69
PUBLICATION.....	71
PERSPECTIVES.....	71
ANNEXES .....	73
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	78

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1. **Phylogénie simplifiée des vertébrés vivants.** Les dichotomies correspondent à l'apparition de nouveaux caractères. Par exemple la flèche rouge indique l'origine des gnathostomes, les vertébrés présentant une mâchoire, en chondrichthyens, les gnathostomes présentant un squelette cartilagineux, et en ostéichthyens, les gnathostomes présentant un squelette osseux. Les chondrichthyens étant plus proches du noeud que les tétrapodes sont dits basaux alors que les tétrapodes étant plus éloignés sont dit dérivés [5]. .....26
- Figure 2. **Schéma du processus de deux cycles de somitogénèse.** Les formes ovales représentent les somites qui se forment suite à l'activité de régulateurs (en vert les acides rétinoïques, en violet les signaux FGF et Wnt, en noir *Mesp2* et en orange les cycles de *Lfng*) le long du mésoderme paraxial [5]. .....27
- Figure 3: **Anatomical characteristics of the vertebrae of *C. fabricii* used in the cluster analysis.** Dotted lines show elements that are not present along the entire vertebral column. Numbers correspond to the characteristics considered for each element. Letters correspond to the various shapes of these elements.....44
- Figure 4: **Development of basidorsals, basiventrals, interdorsals, transverse processes and ribs of *C. fabricii* from 2.9 to 28.2 cm in TL.** The development in the cervical and lumbar regions is similar to the thoracic region but differs from the cervical (i.e., ribs are anterior to vertebrae and there is no transverse process) and lumbar regions (i.e., absence of ribs and transverse process on basiventral). After 18 cm, shape does not change and structures increase proportionally in size. Light grey corresponds to chondrified elements. Dark grey corresponds to mineralized elements. Bd/na, basidorsal/neural arch; bv/ha, basiventral/hemal arch; bv/tr.p, basiventral/transverse process; f, foramen; id, Interdorsal; r, rib. a, anterior; p, posterior; d, dorsal; v, ventral .....47
- Figure 5. **A) Transversal and B) Lateral representation of vertebrae according to regions in *C. fabricii*.** Light grey corresponds to chondrified elements. Dark grey corresponds to mineralized elements. bd/na, basidorsal/neural arch; bv/ha,

basiventral/hemal arch; bv/tr.p, basiventral/transverse process; c, centrum; f, foramen; id, interdorsal; iv, interventral; r, rib; oc, outer layer of centrum..... 48

Figure 6: **Regionalization and anomalies of 93 specimens of *C. fabricii* ranging from 3.6 to 28.2 cm in TL.** Each line represents one specimen corresponding to antero-posterior body axis (from left to right). Specimens are listed from top to bottom in progressive size (TL). Stars represent anomalies. Colors correspond to regions. ERP, embryonic regionalization pattern; TRP, transitional regionalization pattern; JRP, juvenile regionalization pattern ..... 52

Figure 7: **Lateral representation of anomalies on vertebrae of *C. fabricii*.** A. Fusion of interdorsal and neural arch, B. fusion of two neural arches, C. duplication of neural arch, D. suppression of mineralized centra, E. fusion of two centra, F. suppression of neural arch, G. partial fusion of hemal arches, H. fusion of hemal arches, I. addition of hemal arch, J. mineralization default, K. two ribs on a vertebra, L. two foramens on a neural arch. Light grey corresponds to chondrified elements. Dark grey corresponds to mineralized elements. Bd/na. basidorsal/neural arch, bv/ha. basiventral/hemal arch, bv/tr.p. basiventral/transverse process, c. centra, f. foramen, id. Interdorsal, r. rib, l/roc. Left/right outer layer of centra. Scale bar = 0.5 mm, top left scale bar: a-e, g, j; bottom right scale bar: f, h, i, k, l..... 54

Figure 8. **Number of (A) chondrified and (B) mineralized vertebral elements and cumulative curve of (C) chondrified and (D) mineralized vertebral elements of *C. fabricii* from 2.9 to 28.2 cm in TL.** Dotted lines represent limit between embryonic and juvenile stages. .... 56

Figure 9: **Regionalization pattern of *C. fabricii* visualized on Oulion *et al.*'s (2012) *Hox* expression diagram of *Scyliorhinus canicula*.** A. *Hox* gene organization in the dogfish. B. Schematic representation of *Hox* gene expression patterns along the anteroposterior axis in the dogfish with corresponding region limits of *C. fabricii* marked with red dashed lines ..... 63



**LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau 1. Tableau récapitulatif des représentations visuelles illustrant la régionalisation de la colonne vertébrale des Selachii..... 32**



## LISTE DES ABREVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

<b>Bd</b>	basidorsal
<b>Bv</b>	basiventral
<b>C</b>	centra
<b>C&amp;S</b>	clearing and staining
<b>ERP</b>	embryonic regionalization pattern
<b>f</b>	foramen
<b>Ha</b>	hemal arch
<b>Id</b>	interdorsal
<b>Iv</b>	interventral
<b>JRP</b>	Juvenile regionalization pattern
<b>loc</b>	left outer layer of centra
<b>Na</b>	neural arch
<b>oc</b>	outer layer of centrum
<b>PCA</b>	principal component analysis
<b>r</b>	rib
<b>roc</b>	right outer layer of centra



<b>Rs</b>	Spearman rank correlation
<b>TL</b>	total length
<b>TRP</b>	transitional regionalization pattern
<b>Tr.p</b>	transverse process
<b>UPGMA</b>	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean



# **Ontogénie de la régionalisation de la colonne vertébrale de l'aiguillat noir (*Centrocyllium fabricii*)**

## **INTRODUCTION GENERALE**

Les poissons incluent ~32 000 espèces vivantes et forment un groupe paraphylétique [1]. De ce nombre, 1188 espèces appartiennent aux chondrichthyens [2], ou poissons cartilagineux, organisés en deux sous classes : les holocéphales regroupant les chimères et les élasmobranches regroupant les raies et les requins. Dans cette étude, l'intérêt sera particulièrement porté sur les Selachii, communément appelé les requins.

Les Selachii sont apparus il y a plus de 410 millions d'années [78]. Ils ont été parmi les premiers organismes modèles utilisés en biologie [3] mais ils ont été mis de côté pendant une longue période en raison de la difficulté de leur étude [4]. Aujourd'hui, leur position phylogénétique basale au sein des gnathostomes (Figure 1), vertébrés à mâchoires, a ravivé l'intérêt des chercheurs [4]. Les organismes avec une position phylogénétique clé, dont la datation de leur apparition correspond à des transitions biologiques, incitent à chercher une base développementale servant d'appui à la théorie de l'ancêtre commun [4]. Effectivement, les Selachii sont les organismes les plus basaux encore vivants à présenter une colonne vertébrale qui entoure la notochorde sur l'ensemble de l'axe antéro-postérieur du corps. Ils ont donc une position pivot concernant ce système qui est reconnu comme une étape clé dans l'évolution [4]. Aujourd'hui, 509 espèces de requins sont répertoriées [2] et

23% sont des Squaliformes [3]. *Centroscyllium fabricii* faisant parti de cet ordre, est un représentant potentiel du deuxième groupe le plus important des Selachii et de leur état ancestral car il fait partie des élasmobranches basaux [58].

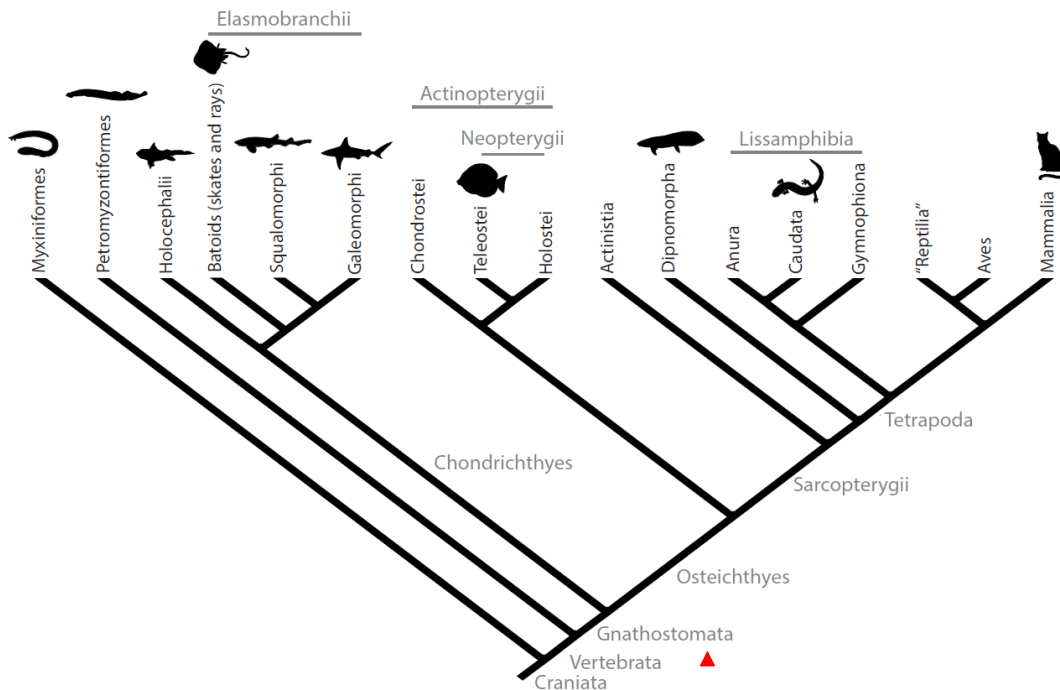


Figure 1. **Phylogénie simplifiée des vertébrés vivants.** Les dichotomies correspondent à l'apparition de nouveaux caractères. Par exemple la flèche rouge indique l'origine des gnathostomes, les vertébrés présentant une mâchoire, en chondrichthyens, les gnathostomes présentant un squelette cartilagineux, et en ostéichthyens, les gnathostomes présentant un squelette osseux. Les chondrichthyens étant plus proches du noeud que les tétrapodes sont dits basaux alors que les tétrapodes étant plus éloignés sont dit dérivés [5].

## LA COLONNE VERTEBRALE

Pour bénéficier de la diversité physiologique formant les organismes, de nombreuses cellules doivent s'associer et se différencier. La formation de la colonne vertébrale fait partie d'une innovation physiologique qui commence au mésoderme paraxial [6]. Le

mésoderme paraxial est segmenté en somites qui sont eux-mêmes divisées en deux : le sclérotome ventro-médial qui est le précurseur des vertèbres et le dermomyotome dorso-latéral qui est le précurseur du derme et des muscles squelettiques [6]. La segmentation a lieu grâce à une ‘horloge de segmentation’ et une ‘onde de front’ [6]. L’horloge de segmentation délivre un signal périodique qui contrôle la production des somites. Pendant l’élargissement axial, ce signal est déplacé postérieurement par un système appelé, ‘onde de front’, qui dépend de Wnt, FGF, et d’acide rétinoïque (Figure 2) [6].

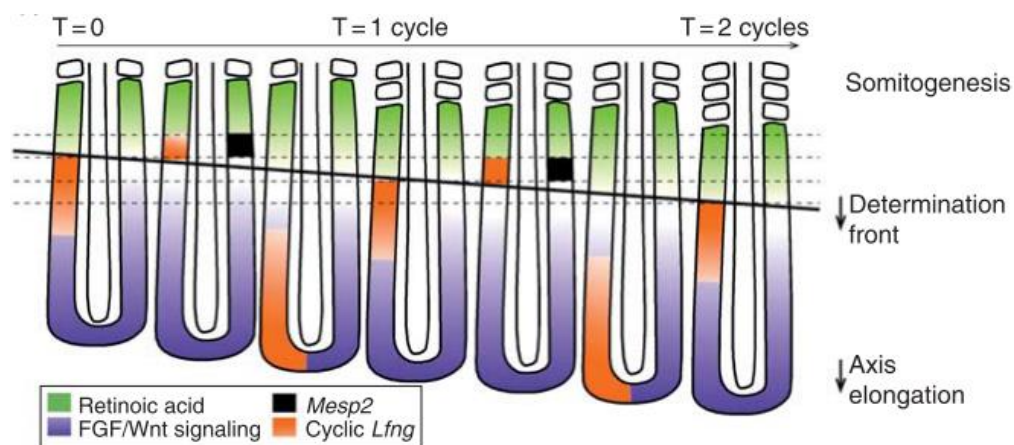


Figure 2. **Schéma du processus de deux cycles de somitogenèse.** Les formes ovales représentent les somites qui se forment suite à l’activité de régulateurs (en vert les acides rétinoïques, en violet les signaux FGF et Wnt, en noir *Mesp2* et en orange les cycles de *Lfng*) le long du mésoderme paraxial [5].

La taille des somites est déterminée par la distance que couvre l’onde de front pendant une oscillation de l’horloge de segmentation [6]. Plus l’horloge de segmentation est rapide, plus le somite sera petit [6]. Le nombre de somites est donc lié à la vitesse de l’horloge de

segmentation et à la taille du mésoderme paraxial qui agit comme un substrat pour l'horloge de segmentation.

Après la segmentation, des interactions entre les cellules épithéliales et mésenchymateuses induisent une condensation qui est suivie d'une différenciation des cellules [7]. Le premier tissu squelettique des vertébrés à se former est du cartilage, ce processus s'appelle la chondrification [8]. Le cartilage est composé de chondrocytes dans une matrice cartilagineuse avec des fibres de collagène et des protéoglycanes [9]. Une deuxième condensation survient au cours du développement menant à un remodelage de la composition chimique de certaines structures vertébrales qui vont alors devenir minéralisées [10, 11]. Différents types de minéralisation sont présents de long de l'axe antéro-postérieur du requin. La minéralisation aréolaire se retrouve au niveau des centra et la minéralisation tessérale au niveau des arcs. La minéralisation tessérale est unique aux élastomobranches [12]. Elle est composée de plusieurs types de collagène, entre autres des collagènes I, II et X [8]. Les plaques résultantes ont une minéralisation dite globulaire du côté de la matrice et prismatique du côté du péri-chondre [13]. La chondrification et la minéralisation des structures ne surviennent pas au même moment et/ou sur les mêmes structures chez tous les organismes [14]. Pour illustrer les trajectoires de chondrification et de minéralisation, et donc les étapes cruciales dans le développement pour la survie de l'organisme, des courbes cumulatives sont utilisées afin de les décrire. Ces courbes permettent de révéler les stades critiques de l'organisme. Les séquences de chondrification

et de minéralisation sont dites organisées car il est possible d'observer un patron de formation des structures liées avec leurs positions le long de l'axe antéro-postérieur [14].

## **LA REGIONALISATION**

L'apparition et les directions de développement des structures vertébrales sont liées à leur position relative le long de l'axe antéro-postérieur du corps des vertébrés [14]. Cette différenciation développementale participe à la régionalisation axiale de l'organisme. La régionalisation axiale correspond à la formation de régions topographiques regroupant des ensembles de vertèbres caractérisées par des similitudes anatomiques, développementales et fonctionnelles. La régionalisation axiale est déjà déterminée au niveau des somites qui ont une taille variant de manière organisée avec l'axe antéro-postérieur [15].

Flower (1847) fut le premier à reconnaître cinq régions le long de la colonne vertébrale des mammifères [16]. Depuis, les régions cervicale, thoracique, lombaire, sacrée et caudale ont été étudiées en détail chez les tétrapodes. Jones *et al.* [17] les ont même considérées à tort comme un caractère unique des mammifères.

La diversité des organismes étudiés pour tenter de comprendre la régionalisation est telle qu'aucun consensus sur le nombre et la définition des régions axiales a été trouvé. Toutefois, le mécanisme de régionalisation a lui été identifié. La présence d'une régionalisation le long de l'axe antéro-postérieur d'un organisme est liée à l'expression de

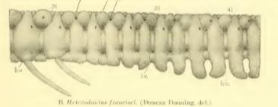
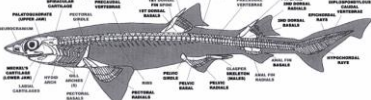
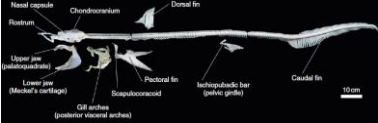
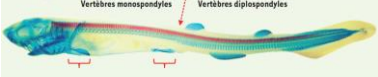
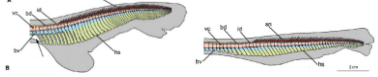
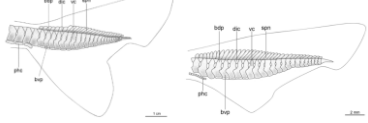
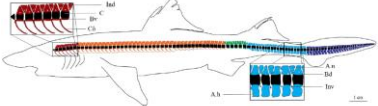
gènes *Hox*. Ces gènes permettent une différenciation de l'axe embryonnaire [18–20]. Ils agissent principalement sur les structures sériées, comme les vertèbres [20]. Ils ont un domaine d'expression restreint corrélé avec la régionalisation [6, 18, 21, 22]. Ils s'expriment suite à l'ouverture de la chromatine, dans le sens 3' → 5', qui rend les gènes disponibles pour la transcription [6]. Les gènes *Hox* suivent une colinéarité spatiale, où les gènes positionnés vers l'extrémité 3' s'expriment antérieurement [23], ainsi qu'une colinéarité temporelle, où les gènes positionnés vers l'extrémité 3' s'expriment plus tôt [22]. La colinéarité spatiale est souvent corrélée avec la colinéarité temporelle mais il existe toutefois des pertes de colinéarité montrant une désorganisation des gènes. Il est par exemple possible d'observer la formation de structures postérieures avant leurs équivalents antérieurs ou encore d'avoir des structures ayant une direction de formation bidirectionnelle [24]. Les régulateurs des gènes *Hox* (acide rétinoïque, Wnt, BMP, Cdx) ont aussi leurs rôles dans la spécialisation axiale [35, 5]. Les gènes *Hox* et leurs régulateurs sont donc responsables en partie de la régionalisation. Leur variation quantitative, spatiale et d'expression est l'une des explications de la diversité de plans corporels observables aujourd'hui.

La condition de la régionalisation chez les Selachii a longtemps été incertaine, établissant un nombre de régions variant de deux à cinq selon plusieurs auteurs [13, 14, 26–29]. Daniel (1934) fut le premier à reconnaître des régions chez les Selachii [29]. Il remarque des différences interspécifiques et intraspécifiques de la composition et de la morphologie des vertèbres le long de l'axe antéro-postérieur [29]. En 1999, Campagno



distingue trois régions : monospondyle précaudal, diplospondyle précaudal et diplospondyle caudal [27]. Un état monospondyle correspond à une vertèbre par myomère alors que un état diplospondyle correspond à deux vertèbres par myomère [30]. En 2011, Claeson remarque des différences entre les vertèbres lombaires, thoraciques et caudales de *Carcharhinus falciformis* [28]. En 2012, Oulion [20] étudie les domaines d'expression des gènes *Hox* de *Scyliorhinus canicula* en se référant à deux régions, monospondyle et diplospondyle. En 2018, deux études présente la diversité morphologique qu'il est possible de retrouver au niveau des vertèbres caudales de l'ordre des Carcharhiniformes [31] et de la famille des Dalatiidae [32]. En 2019, Lebel *et al.* utilisent une méthode de groupement afin de déterminer la régionalisation chez *Centroscyllium fabricii* [14]. Pour cela, ils ont codé huit caractères anatomiques sur chacune des vertèbres d'un spécimen. L'indice de Dice a été choisi pour effectuer cette analyse. Cet indice met l'accent sur la double présence d'un caractère et limite le biais d'absence d'un caractère. Ils découvrent alors cinq régions le long de l'axe antéro-postérieur de la colonne vertébrale du spécimen étudié et décrivent la morphologie des vertèbres retrouvées dans chacune des régions. Le tableau 1 présente les représentations visuelles des études citées précédemment.

Tableau 1. Tableau récapitulatif des représentations visuelles illustrant la régionalisation de la colonne vertébrale des Selachii.

Représentation visuelle	Description de la représentation visuelle	Référence
	Schéma montrant la région lombaire d'un Selachii	Daniel (1934) [29]
	Schéma de la vue latérale du squelette complet d'un Neoselachii	Campagno (1999) [27]
	Vue latérale du squelette de <i>Carcharhinus falciformis</i> avec une distinction entre la partie axiale, viscérale et appendiculaire	Claeson (2011) [28]
	Photo d'un spécimen doublement coloré de <i>Scyliorhinus canicula</i> . Les accolades présentent l'insertion des nageoires pectorales et pelviennes. La flèche marque la transition entre les vertèbres monospondyles et diplospondyles	Oulion (2012) [20]
	Disparité morphologique de la nageoire caudale de deux Carcharhiniformes ( <i>Galeorhinus galeus</i> et <i>Schroederichthys saurisqualus</i> )	Moreira (2018) [31]
	Disparité morphologique de la nageoire caudale de deux Dalatiidae ( <i>Isistius plutodus</i> et <i>I. brasiliensis</i> )	Figueiredo Petean (2018) [32]
	Schéma de la régionalisation axiale de <i>Centroscyllium fabricii</i> . Les différentes couleurs correspondent aux régions cervicale en rouge, thoracique en orange, lombaire en vert, 'sacrée' en bleu et caudale en violet	Lebel <i>et al.</i> (en prép.) [14]

La régionalisation, correspondant à la formation de régions regroupant des ensembles de vertèbres, semble être un modèle idéal pour comprendre la modularité [28, 34, 35, 7]. La modularité correspond à la distinction d'unités et de sous-unités (développementale, phénotypique et anatomique) grâce à leurs niveaux d'autonomie et d'intégration (interdépendance des traits) [4, 33–35]. L'une des hypothèses concernant la modularité est la duplication-différenciation [36]. Les modules proviendraient entre-autres de la duplication génétique. Étant la réplique d'un module déjà existant, les contraintes liées à ce dernier sont restreintes et il peut donc acquérir une nouvelle fonction en se différenciant [23, 33]. Ainsi, au cours de spécialisations morphologiques, la régionalisation semble se complexifier et voir son nombre de modules augmenter jusqu'à une stabilisation [17]. Il est possible de penser qu'un module basal serait donc plus simplement organisé qu'un module dérivé. La génération de modules semble être cruciale pour organiser de manière optimale les systèmes digestif, respiratoire, nerveux et squelettique et donc les organismes dans leur totalité. Il semble que cette organisation permette même une économie d'énergie en réduisant les interactions inutiles entre les modules [37]. La modularité semble être un concept qui pourrait expliquer les variations génétiques et morphologiques observées sur les systèmes et les organismes. C'est pourquoi elle est de plus en plus utilisée pour les études concernant l'évolution et le développement.

Certains modules semblent se fixer au cours du temps. Effectivement, la duplication-différenciation peut rendre certains modules nécessaires au bon fonctionnement d'autres et donc impliquer une fixation de ces premiers. Par exemple, sur 5400 espèces de

mammifères, presque tous ont sept vertèbres cervicales et ceux qui ne présentent pas morphologiquement ces sept vertèbres chez le stade adulte semblent les présenter au cours du développement embryonnaire [38]. La stabilisation du nombre de vertèbres cervicales est un exemple d'intégration morphologique. La fixation de ce module semble être due à son importance pour supporter les organes comme le diaphragme ayant un rôle dans la respiration et la locomotion [39]. Un autre exemple est l'importance de la fixation des modules positionné antérieurement à l'axe du corps chez les actinoptérygiens pour permettre le bon développement de la vessie natatoire qui a aussi un rôle dans la locomotion [40]. Il est toutefois clair que d'autres modules restent faiblement intégrés et sont donc plus sujet à subir des changements. Par exemple, la région sacrale a subi différentes modifications suite à la disparité des appendices postérieurs. Elle peut être composée de vertèbres fusionnées (sacrum) chez les mammifères ou non fusionnées chez les poissons [21]. Il est intéressant de regarder comment ce concept de modularité s'exprime le long de la colonne vertébrale des requins pour étudier la variabilité des modules axiaux. En effet, il est probable que les requins avec leur position basale présentent une signature particulière du concept de modularité. Notre étude permet donc d'étudier les patrons d'évolution des modules avec l'hypothèse de la régionalisation comme support.

## LES ANOMALIES

Lors du développement il est possible qu'un organisme manifeste des anomalies anatomiques. Une anomalie est une incapacité homéostatique à réguler un stress génétique ou environnemental [41]. Diverses raisons peuvent être à la source d'anomalies : un problème nutritionnel (vitamine ou minéraux), une infection bactérienne, un traitement antibiotique, la pollution, la température, l'intensité d'élevage, un désordre génétique, une dysfonction du métabolisme [40–42]. Les anomalies sont généralement fréquentes le long de la colonne vertébrale et se présentent comme des fusions, des divisions, des additions, des suppressions ou des malformations de structures. Elles peuvent être majeures (touchant plusieurs vertèbres) ou mineures (touchant pas plus de trois vertèbres). Beaucoup d'études portent sur les anomalies et leurs impacts sur les poissons d'élevage [40–44] mais aucune ne traite les anomalies développementales chez les chondrichthyens.

## OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

Diverses questions se posent lorsque nous regardons le développement de la colonne vertébrale d'un requin : **Concernant la formation des somites, une espèce a-t-elle une segmentation stable?** Pour l'observer, nous avons étudié le pléomérisme de *C. fabricii*. Le pléomérisme est la corrélation entre la taille et le nombre de parties méristiques, ici les vertèbres. Il a été reconnu au niveau des familles et des espèces mais les exemples considérant la variation intraspécifique sont rares, d'autant plus chez les chondrichthyens

[45]. Nous allons donc observer si la série de croissance d'une espèce, *C. fabricii*, présente un nombre de vertèbre variant avec la taille du spécimen.

**Concernant la chondrification et la minéralisation, des stades critiques sont-ils discernables lors du développement de *C. fabricii*?** Une série de croissance permet de reconnaître les patrons développementaux de l'apparition des éléments cartilagineux et minéralisés et donc de distinguer, s'ils sont présents, les stades clés du développement du squelette.

**Concernant la régionalisation, des variations de la régionalisation sont observables entre les espèces mais est-t-il possible d'en trouver au sein d'une espèce ?** La méthode de groupement utilisée par Lebel *et al.* (2019) a été appliquée à l'ensemble de la série de croissance de *C. fabricii* pour déterminer si la régionalisation peut changer au cours du développement.

**Enfin, qu'en est-il des anomalies retrouvées le long de l'axe antéro-postérieur de *C. fabricii* ?** L'ensemble de la série de croissance de *C. fabricii* a été observé pour relever quantitativement et qualitativement la présence d'anomalies vertébrales.

Pour répondre à ces questions, une série de croissance de *C. fabricii* doublement colorée a été utilisée. Une série de croissance est un groupe de spécimens classés selon un proxy, ici la longueur totale, pour reconstruire une série ontogénétique. L'utilisation de séries de

croissance est importante en évolution du développement pour comprendre la présence de stades critiques, l'apparition d'anomalies et ce qui a pu affecté l'évolution des systèmes nerveux, squelettique, digestif et respiratoire [4, 15]. Le protocole de double coloration permet de révéler les différents tissus squelettiques à l'aide de colorants. Le bleu Alcian se fixe sur les glycosaminoglycanes et donc révèle les structures cartilagineuses alors que le rouge Alizarin se fixe sur les structures calcifiées (minéralisées ou ossifiées). Les 110 spécimens colorés sont ensuite codés de manière binaire afin de qualifier et quantifier la présence ou l'absence de caractères (e.g., présence d'un interdorsal, présence d'une côte entre deux vertèbres). Chaque vertèbre est codée pour 32 caractères morphologiques (Figures 3). Enfin, une analyse de groupement UPGMA (« Unweighted pair group method with arithmetic mean ») est utilisée afin de comparer chacune des vertèbres et révéler un indice de similarité. Ainsi les vertèbres similaires partageront plus de caractères en commun, elles auront donc un indice de similitude plus élevé et seront regroupées. On obtient alors une régionalisation pour chacun des spécimens de la série de croissance.

# CHAPITRE 1

## SHARK VERTEBRAL COLUMN: REGIONALISATION, ANOMALIES AND CRITICAL STAGES

### 1.1 INTRODUCTION

With more than 67 000 species [46], vertebrates form a monophyletic group comprising only ~2–4% of living organisms [12]. Despite this small percentage, they display an astonishing variety of size and shape [12]. It has been recognized that part of this disparity is due to various aspects such as appendage diversity and organization [1], variation of body part elongation [39, 49] and regionalization [17, 19, 40, 48]. Regionalization (i.e., unit subdivision) can be found in various anatomical systems. Here, we will focus on axial regionalization through ontogeny to hypothesize its contribution to the diversity and disparity among organisms. The axial regionalization is the formation of topographic regions including vertebrae that are characterized by anatomical, developmental and functional similarities. This regionalization is recognized to play a role in vertebrate specialization that corresponds to the optimization of an organism through plasticity and adaptation. Specialization organizes optimally the vertebral column to support various functions such as locomotion and respiration [16, 17, 49]. Basal vertebrates tend to show fewer regions than derived ones [17]. The vertebral column seems to have evolved from a simple and continuous organization, with few structures and few vertebrae divergence along the body axis, to a regionalized organization.



Regionalization was first recognized in mammals [16] with the classic five regions: cervical, thoracic, lumbar, sacral and caudal. Some authors still consider it as ‘a unique feature of mammals’ [17]. However, for decades, regionalization has been found in various taxa. Agnathans show a simple regionalization [9, 50, 51]. The Inshore hagfish, *Eptatretus burger*, shows cartilaginous caudal nodes-like arcualia [51]. Those arcualia have the same shape but regionalization is considered because they are only present in the caudal part. The Devonian anapsid *Euphanerops longaevus* shows a transition similar to the lumbo-sacral region of tetrapods [50]. The Sea lamprey, *Petromyzon marinus*, shows large and bifid anterior arcualia versus small arcualia posteriorly [9]. Furthermore, there is an important regionalization disparity among actinopterygians: two regions have been recognized in *Acipenser baerii* [52], three in *Auxis thazard* [53], four in *Danio rerio* [54], *Ancorhynchus mykiss* [41] and *Lutjanus benglensis* [55], five in *Tarrasius problematicus* [21] and six in *Oncorhynchus tshawytscha* [56] and *Thunnus thynnus* [57]. Selachian regionalization is intriguing since they are the most basal, extant vertebrates with a complete vertebral column (i.e., column surrounding the notochord and going from behind the head to the most posterior part of the body). According to the literature, sharks have from two to five regions based mainly on various observations (Tableau 1) [13, 14, 26–29].

A potential explanation for the emergence of new regions and the disparity of regionalization is that regions are modular [21, 33, 34]. Broadly defined, modularity corresponds to the decomposition into subunits called modules. Connectedness within modules (integration) is high compared to connectedness among modules [47]. Different

kinds of modules are defined according to the process (i.e., developmental, variational) they are involved [4, 33–35]. Modules might be susceptible to duplication, dissociation, divergence and co-option [1]. Generation of modules is crucial to the evolvability because module repetition induces formation of weak connections reducing the interference and allowing emergence of morphological and functional innovations [47]. As Larouche *et al.* [1] reported “modules can be defined as units that may develop and evolve quasi-independently from other modules.” Studying vertebral column modularity in organisms with key phylogenetic position could account for regionalization disparity.

Tetrapod regionalization disparity has been studied in detail but the condition for basal gnathostomes is poorly known. We studied *Centroscyllium fabricii*, a basal elasmobranch [58], representative of the second most diverse group of Selachii, the Squaliformes [3]. Elasmobranchs have a key phylogenetic position by being the first extant vertebrates with a complete vertebral column. We described the skeletal development of *C. fabricii* by using an extensive ontogenetic series of cleared and stained specimens ranging from 2.9 to 28.2 cm in total length. Regionalization was determined using a clustering analysis [14]. Using such an extensive ontogenetic series allowed us (1) to characterize modular integration based to intraspecific variation of regionalization, (2) to investigate the occurrence of anomalies (i.e., unusual character compared to the complete studied group) pattern, and (3) to identify critical stages.

## 1.2 MATERIAL AND METHODS

### **Specimens**

A total of 110 specimens (85 embryos took from the mother belly and 25 free swimming juveniles) of the shark *C. fabricii* (Squaliformes; Etmopteridae), ranging from 2.8 to 28.2 cm in total length (TL), were used to establish an ontogenetic series. Total length (TL) was used as a size proxy. These specimens were caught in the St. Lawrence River (Quebec, Canada) during the annual summer surveys (2007-2017) performed by Canada Fisheries and Oceans (Maurice Lamontagne Institute). Specimens were frozen at -20°C on board of the research vessel.

### **Clearing and staining of specimens**

The clearing and staining (C&S) acid-free protocol of Walker and Kimmel (2006) was used to reveal cartilaginous structures in blue (Alcian bleu) and mineralized structures in red (Alizarine Red S). Coding, drawing and pictures have been done on C&S specimens. All features were observed with a stereomicroscope Leica MZ16A. A digital camera (AmScope MU1000) with the software Toupview (v.3.7, AmScope, 2013) was used to take images of anatomical elements. Height and width of first cervical neural arch and first ‘sacral’ hemal arch was measured with the software ImageJ (v.Fiji, Schindelin, 2012) [59]. Drawings were vectorized on Adobe Illustrator CC (version 19.0.0, Adobe System Incorporated, 2013).

### **Statistical analyses**

Spearman rank correlation ( $r_s$ ) was used between (1) the total number of vertebrae and TL, (2) the size of arches and TL, and (3) the number of chondrified and mineralized elements and TL. These correlations were used (1) to investigate pleomerism, (2) to characterize structure formation, and (3) to investigate skeletal development and identify critical stages.

Binary data were collected for each specimen to investigate regionalization. Thirty-two characters on the occurrence of anatomical elements [i.e., absence (0) or presence (1)], developmental states [i.e., chondrified (0) or mineralized (1)] and shape of vertebral structures (Figure 3) were recorded. Coding was done on the left side of specimens except if it was not possible. Characters were analyzed with Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) using Dice indices. The UPGMA was used to recognize vertebral clusters on each individual, subsequently interpreted as axial regions, based on their Dice similarities. Dice index was chosen because it emphasizes double presence and reduced bias of a yet undeveloped structure. Regionalization has been established by identifying five clusters, on each individual dendrograms, according to Dice similarities. The threshold was set at five considering the optimal cluster number showed by the clustering analysis. Many anatomical structures were not developed in the smaller specimens from 2.9 to 3.6 cm TL; thus, many characters could not be coded for and were excluded from the UPGMA analysis. Permutation test for one-way ANOVA (999

permutations) was used to identify divergent numbers of vertebrae composing axial regions [60]. Differences in term of the number of vertebrae were tested with a Kruskal-Wallis test. Number of vertebrae per axial region was used in a principal component analysis (PCA) on covariance matrix to investigate relation among regional size. Spearman rank correlations were used between (1) the number of vertebrae per axial region and TL in order to investigate the contribution of regions to TL, (2) the number of anomalies and the number of vertebrae in order to notice segmentation dysfunction occurrences, (3) the number of anomalies and TL in order to compare the occurrence of anomalies considering both the number of meristic parts and TL, and (4) the number of vertebrae per axial region and the number of vertebrae separating extremities of regions and the presence of anomalies in order to investigate if anomalies occurrence is more likely to occur within or out of a region.

We used R software (v3.6.1) and statistical application were verified (outstanding variables could not be deleted because they were verified).

## Terminology

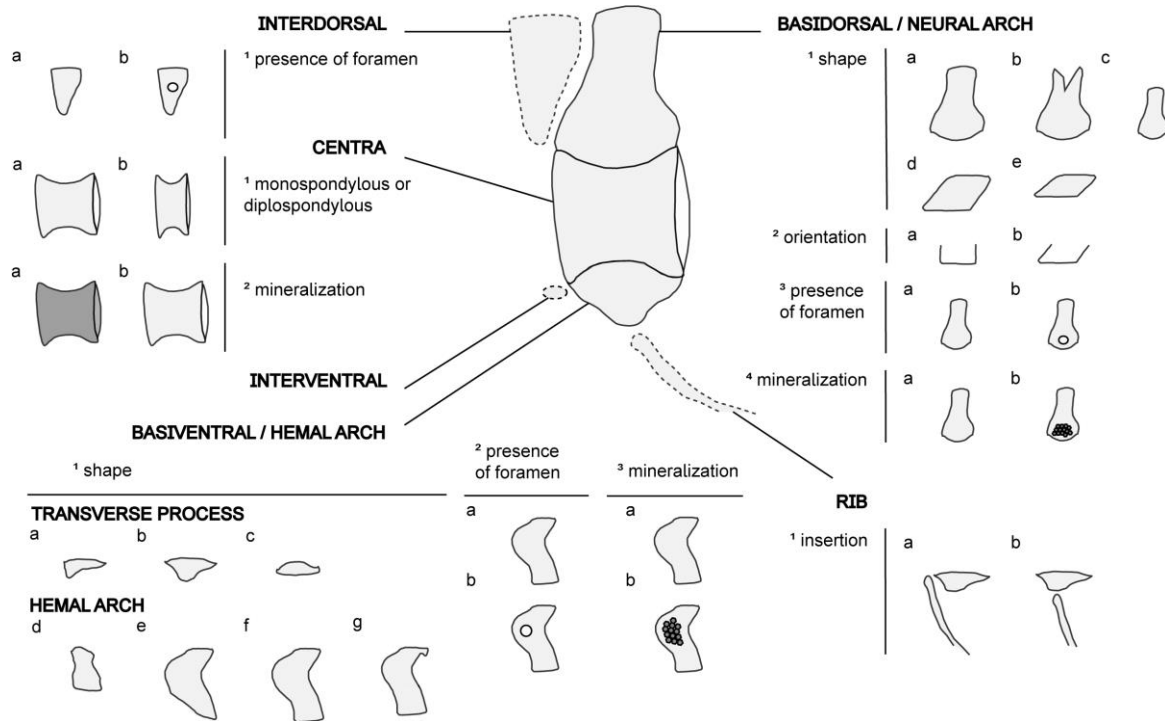


Figure 3: **Anatomical characteristics of the vertebrae of *C. fabricii* used in the cluster analysis.** Dotted lines show elements that are not present along the entire vertebral column. Numbers correspond to the characteristics considered for each element. Letters correspond to the various shapes of these elements

Nomenclature of vertebral structures comes from previous studies [27, 30, 61–63]. Basiventrals and basidorsals elongate through development to become transverse processes or hemal arches and neural arches [62]. Arches and their associated basi-structures are not separate but are both present [30, 62]. Transverse processes are treated as a separate structure [61]. Some structures are not merged with the centra (i.e., interdorsals, interventrals, ribs and transverse process). To code them, a structure is considered associated with a vertebra when it is placed on its anterior side to follow sclerotome limits [15, 30, 64].

### 1.3 RESULTS

#### **Relation between total number of vertebra and total length**

We investigated if TL could be used as a proxy when studying the development of the vertebral column. Only a weak relation was found between the total number of vertebrae and TL ( $r_s = 0.319$ ;  $P < 0.001$ ). The number of vertebrae increases from 82 to 94 in specimens from 2.9 to 5 cm TL ( $r_s = 0.696$ ;  $P < 0.001$ ). In specimens ranging from 5 to 28.2 cm TL, the number of vertebrae is stable. Based on the complete growth series, TL is not an appropriate proxy to estimate the total number of vertebrae.

#### **Chondrification of vertebral elements**

Centra chondrification starts at 2.9 cm TL. From the middle of the double cone, each centrum expands anteriorly and posteriorly giving a cylindrical form. Starting as nodes, basidorsals and basiventrals expand anteriorly and posteriorly giving a rectangular shape that subsequently develop distally into a triangular shape. From the triangular shape, each structure changes in form depending on their axial position. Basidorsals start to form at 2.9 cm TL. Width and height of basidorsals are highly correlated with TL ( $r_s = 0.9$ ;  $P < 0.001$ ). Their width increases up to 2.5 mm and their height up to 3 mm from 2.9 to 28.2 cm TL. Once they have reached a triangular shape, they keep a triangular shape in the cervical, thoracic, lumbar and 'sacral' regions. In the caudal region, there is a fusion between interdorsals and neural arches giving a rectangular shape to basidorsals. Basiventrals form

at 3.01 cm following the same developmental pattern as basidorsals. Width and height of basiventrals are highly correlated with TL ( $r_s = 0.9$ ;  $P < 0.001$ ). The width increases up to 2.5 mm and the height increases up to 4.9 mm from 2.9 to 28.2 cm TL. When they have reached the triangular shape, the distal parts of the 'sacral' and caudal basiventrals expand forming the distinctive rectangular shape of the hemal arches. As they grow distally, 'sacral' hemal arches keep a rectangular shape but caudal hemal arches expand anteriorly forming a rounded shape on the arches. Some caudal hemal arches also display a round extension on the posteroventral side of the rectangular shape (Figure 4). Thoracic basiventrals keep triangular shapes called transverse processes, pointing laterally. Rarely, some posterior cervical vertebrae also show transverse process. Finally, lumbar basiventrals have intermediate rectangular shape between transverse processes and hemal arches. Some structures are present only along a small part of the vertebral column (i.e., ribs, interdorsals, interventrals). They develop proximodistally. Ribs chondrify at 3.36 cm TL from a node they develop as a long ribbon shape. Ribs are sometimes bifid in the cervical region. Interdorsals form at 4.65 cm TL, from a node they develop into a triangle pointing ventrally (Figure 4). Finally, interventrals form at 17.31 cm TL and keep a nodular shape. The last vertebra-composed of centra, basidorsal and basiventral-forms an arrow-shape pointing posteriorly (Annex II). It is possible to notice three different morphological types of the last vertebra: centra only fused with basidorsal, centra only fused with basiventral or central fused with both basal structures.



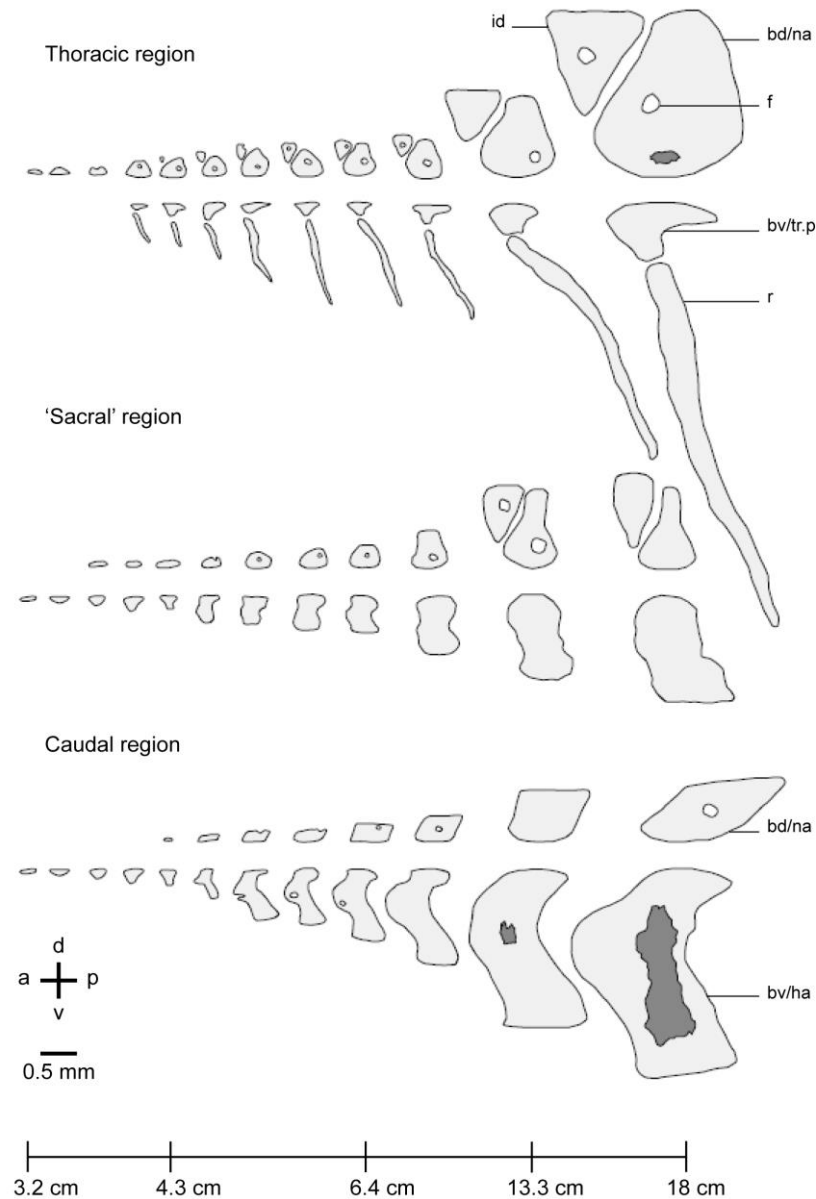


Figure 4: **Development of basidorsals, basiventrals, interdorsals, transverse processes and ribs of *C. fabricii* from 2.9 to 28.2 cm in TL.** The development in the cervical and lumbar regions is similar to the thoracic region but differs from the cervical (i.e., ribs are anterior to vertebrae and there is no transverse process) and lumbar regions (i.e., absence of ribs and transverse process on basiventral). After 18 cm, shape does not change and structures increase proportionally in size. Light grey corresponds to chondrified elements. Dark grey corresponds to mineralized elements. Bd/na, basidorsal/neural arch; bv/ha, basiventral/hemal arch; bv/tr.p, basiventral/transverse process; f, foramen; id, Interdorsal; r, rib. a, anterior; p, posterior; d, dorsal; v, ventral

Following chondrification and mineralization, vertebrae reach their final shape. Description of vertebrae morphology according to axial position has already been done on one specimen of *C. fabricii* by Lebel *et al* (2018). The morphology of vertebral types according to region is illustrated on figure 5.

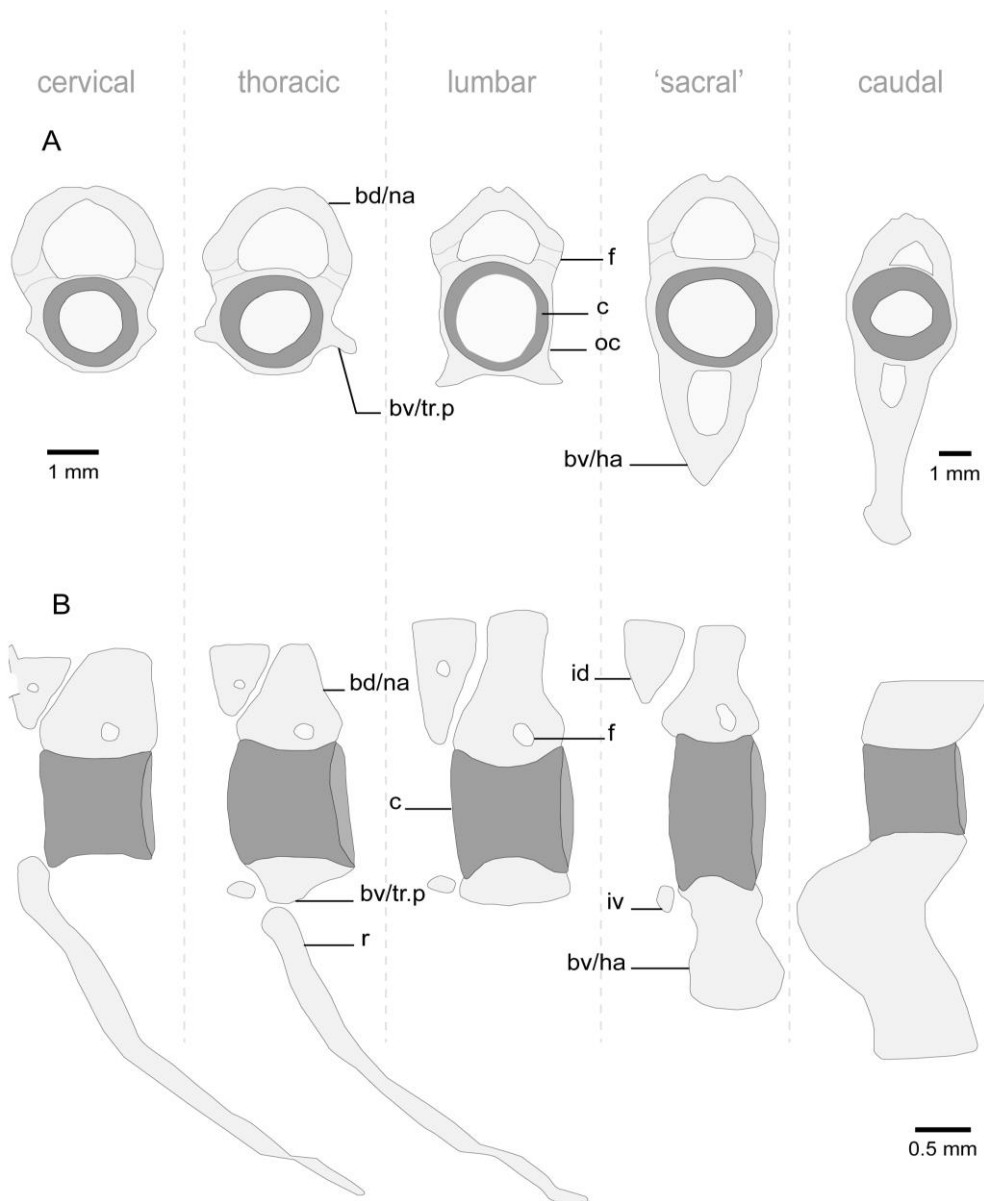


Figure 5. **A) Transversal and B) Lateral representation of vertebrae according to regions in *C. fabricii*.** Light grey corresponds to chondrified elements. Dark grey corresponds to mineralized elements. *bd/na*, basidorsal/neural arch; *bv/ha*, basiventral/hemal arch; *bv/tr.p*, basiventral/transverse process; *c*, centrum; *f*, foramen; *id*, interdorsal; *iv*, interventral; *r*, rib; *oc*, outer layer of centrum

### **Regionalization during ontogeny**

The regionalization of the vertebral column of 110 specimens of *C. fabricii* has been determined by cluster analyses (Figure 6). Not all characters could be coded for individuals ranging from 2.9 cm TL to 3.6 cm TL because some elements were not yet developed; thus, a regionalization pattern was revealed for 93 individuals using UPGMA analyses. On average, the cervical region has 6.73 vertebrae, thoracic has 33.36, lumbar has 5.79, ‘sacral’ has 26.27 and caudal has 21.75 (Annex III). Permutation ANOVA shows significant differences among the number of vertebrae composing each region ( $F_{4,345} = 438.55$ ;  $P < 0.001$ ). A Kruskal-Wallis test shows that the number of vertebrae differs significantly among the regions except for the cervical and lumbar regions as well as for the ‘sacral’ and caudal regions. The PCA on the number of vertebrae per region (PCA1 and PCA2 accounts for 68.6% of the variation) shows that the number of vertebrae composing the ‘sacral’ region is negatively correlated with that of the caudal region. The number of vertebrae composing the cervical and lumbar regions is negatively correlated with that of the thoracic region (Annex IV). The number of vertebrae varies greatly in the ‘sacral’ and caudal regions ( $SD = 9.87$  and  $9.46$ , respectively). Part of this variation could be associated with the difficulty to distinguish the nodes-like hemal arches from ‘sacral’ arches to caudal ones. Node like structures, being complex to distinguish, embryos present a particularly long ‘sacral’ region giving the embryonic regionalization pattern from 3.6 to 5.2 cm TL. A transitional period between 5.3 and 8.5 cm TL shows a specialization along the body axis in arch shapes. Arches will progressively reach their final shape to gain their function (Figure

4). Some embryos retain early regionalization pattern but others, having a substitution of 'sacral' to caudal region, present a juvenile regionalization pattern that is observed from 8.5 to 28.2 cm TL. During this period, shapes are stable, but structures get bigger progressively. Cervical, thoracic and lumbar regions do not seem to have ontogenetic pattern of regionalization in contrast to the 'sacral' and caudal regions, they are more stable through development. Spearman rank correlations indicate that the number of vertebrae of anterior region do not have a relation with TL [cervical  $r_s = 0.079$  ( $P = 0.453$ ); thoracic  $r_s = -0.117$  ( $P = 0.266$ )] but the number of vertebrae of posterior regions does [lumbar  $r_s = 0.222$  ( $P = 0.032$ ); 'sacral'  $r_s = -0.413$  ( $P < 0.001$ ); caudal  $r_s = 0.325$  ( $P < 0.001$ )]. The number of vertebrae per axial region does not have an impact on the total number of vertebrae [cervical  $r_s = -0.017$  ( $P = 0.865$ ); thoracic  $r_s = 0.181$  ( $P = 0.083$ ); lumbar  $r_s = -0.08$  ( $P = 0.445$ ); caudal  $r_s = 0.038$  ( $P = 0.715$ )] except for the 'sacral' region [ $r_s = 0.338$  ( $P < 0.001$ )] (see Annex V).

Regionalization is maintained among individuals with some variations leading to transitional zone. In terms of morphology, the transition of vertebrae between regions is mainly gradual. From the cervical to the thoracic regions, rib insertion shifts gradually from: (1) in-between two vertebrae, (2) anterior side of the vertebra, and (3) middle of the vertebra. Transverse processes follow ribs shift. From the thoracic to the lumbar regions, ribs become smaller until they are absent, transverse processes become larger and migrate from lateral to ventral, and neural arches become larger. From the lumbar to the 'sacral' regions, hemal arches become longer and neural arches are large enough to divide into a

diplospondylous condition. From the 'sacral' to the caudal regions, hemal arches become longer and expand anteriorly and neural arches begin to fuse with interdorsals. Most morphological transitions occur ventrally showing differences at each region.

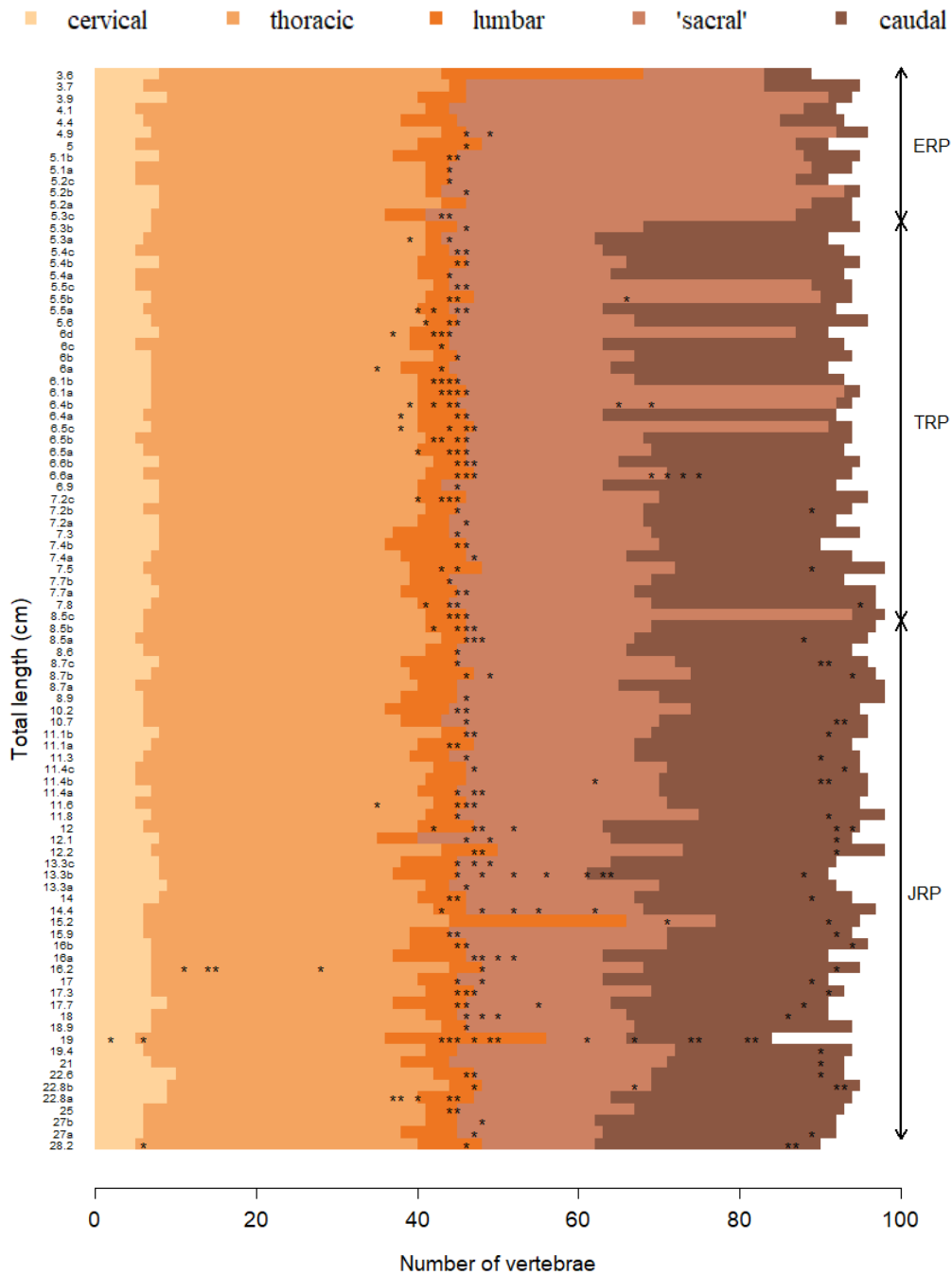


Figure 6: **Regionalization and anomalies of 93 specimens of *C. fabricii* ranging from 3.6 to 28.2 cm in TL.** Each line represents one specimen corresponding to antero-posterior body axis (from left to right). Specimens are listed from top to bottom in progressive size (TL). Stars represent anomalies. Colors correspond to regions. ERP, embryonic regionalization pattern; TRP, transitional regionalization pattern; JRP, juvenile regionalization pattern

### **Developmental anomalies**

Anomalies (i.e., fusion, division, addition, suppression, malformation) are frequent along the vertebral column (Figures 6 et 7). On 110 specimens, only 12 had no anomaly and, among these, 11 were early embryos (Figure 6). On the remaining 98 specimens, 300 anomalies are reported (average of 2.88 anomalies per specimen). A maximum of 15 anomalies was found on a 19-cm TL specimen (Figure 6); this specimen also has a low number of vertebrae of 84 rather than 93. There is no significant correlation between the number of anomalies and the number of vertebrae ( $r_s = 0.139$ ;  $P = 0.178$ ). Weak correlation is found between the number of anomalies and TL ( $r_s = 0.443$ ;  $P < 0.001$ ). The percentage of anomalies varies along the vertebral region: lumbar (45.38%), 'sacral' (26.91%), caudal (19.28%), thoracic (8.03%) and cervical (0.4%) regions. Arches are the vertebral structures with the highest proportion of anomalies (hemal arches, 56%; neural arches, 36.7%) (Figure 7 A-C, F-I). Centra (6.7%) (Figure 7 D, E) and ribs (Figure 7 K) (0.7%) have low percentages of anomalies. The presence of additional vertebral elements is the most frequent anomaly (74%) but it is also common to observe fusions (10.3%; Figure 7 A, B, E, G, H). The average number of vertebrae per region is highly correlated with the number of vertebrae separating extremities of a region and the presence of anomalies ( $r_s = 0.9$ ;  $P = 0.08$ ).

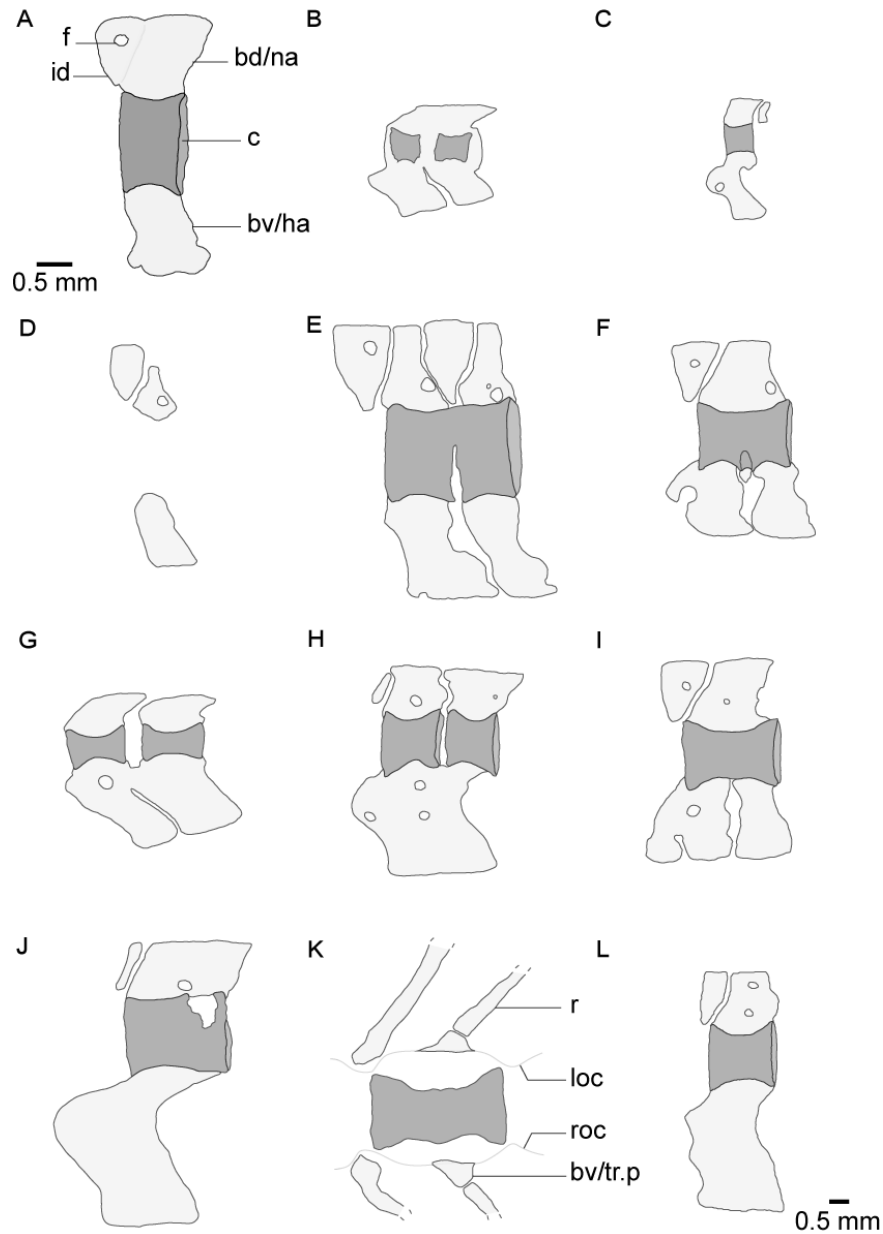


Figure 7: **Lateral representation of anomalies on vertebrae of *C. fabricii*.** A. Fusion of interdorsal and neural arch, B. fusion of two neural arches, C. duplication of neural arch, D. suppression of mineralized centra, E. fusion of two centra, F. suppression of neural arch, G. partial fusion of hemal arches, H. fusion of hemal arches, I. addition of hemal arch, J. mineralization default, K. two ribs on a vertebra, L. two foramens on a neural arch. Light grey corresponds to chondrified elements. Dark grey corresponds to mineralized elements. Bd/na. basidorsal/neural arch, bv/ha. basiventral/hemal arch, bv/tr.p. basiventral/transverse process, c. centra, f. foramen, id. Interdorsal, r. rib, l/roc. Left/right outer layer of centra. Scale bar = 0.5 mm, top left scale bar: a-e, g, j; bottom right scale bar: f, h, i, k, l



### **Identification of critical stages**

A positive correlation was found between the number of chondrified elements and TL ( $r_s = 0.919$ ;  $P < 0.001$ ). Chondrified elements have a saltatory development from 57 elements to approximately 400 in specimens from 2.9 to 5 cm TL, while stabilization of the number of elements starts at 5 cm TL (Figure 8A, C). A positive correlation was found between the number of mineralized elements and TL ( $r_s = 0.729$ ;  $P < 0.001$ ). Mineralized elements have a saltatory development passing from the absence of mineralized element at 12.2 cm to the presence of 95 elements at 13.3 cm (Figure 8B, D). This critical stage is simultaneous with the transition between embryos and juveniles. From 13 to 28.2 cm TL, the number of mineralized elements increases slowly and does not seem to stabilize based on our sample size available (Figure 8). At 28.2 cm TL, 41.59% of the endoskeletal elements are mineralized.

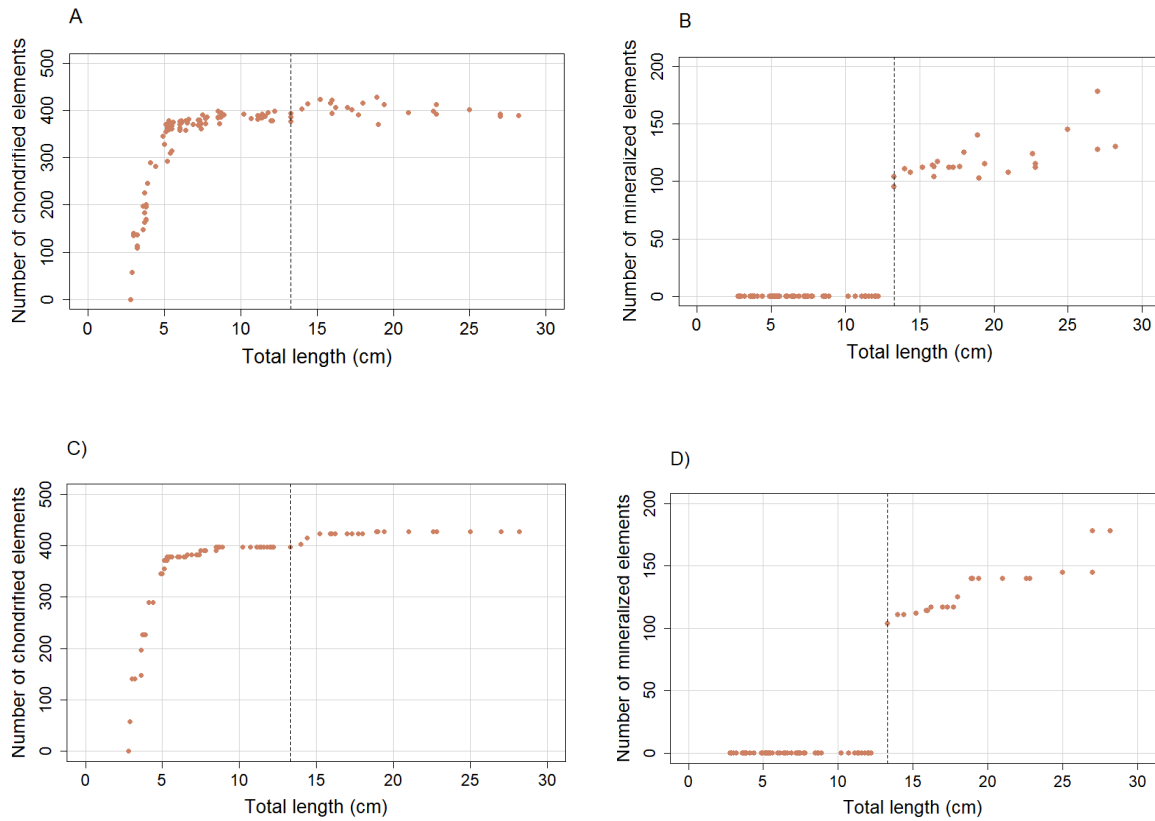


Figure 8. Number of (A) chondrified and (B) mineralized vertebral elements and cumulative curve of C) chondrified and D) mineralized vertebral elements of *C. fabricii* from 2.9 to 28.2 cm in TL. Dotted lines represent limit between embryonic and juvenile stages.

## 1.4 DISCUSSION

In this study, we have shown that in embryos and juveniles of *C. fabricii*: (1) there is no correlation between the total number of vertebrae and TL, (2) there is a regionalization pattern changing during ontogeny showing five axial regions, (3) anomalies are not randomly distributed, and (4) two critical developmental stages are present.

### **Relation between the total number of vertebrae and total length**

In *C. fabricii*, TL is not correlated with the total number of vertebrae. The vertebral column in sharks derived from the paraxial mesoderm. Paraxial mesoderm is segmented into somites that are divided in two components: (1) the ventromedial sclerotome which is a vertebral precursor and (2) the dorsolateral dermyotome which is a dermis and skeletal muscle precursor [6]. Segmentation will occur owing to the segmentation clock and wavefront. Somite size is defined by the distance covered by the wavefront during one oscillation period of the segmentation clock. Faster the segmentation clock is, smaller the somite will be [6]. Organisms of same length but with different segmentation clock speed can then have different numbers of vertebrae [65].

Pleomerism (i.e., the correlation between size and number of meristic parts) has been reported at the family and species levels [45]. Intraspecific examples are rare [45]. Springer and Garrick (1964) noticed that the number of vertebrae varies within shark species [66]. The number of precaudal vertebrae is established before embryonic development but caudal vertebral number changes until the end of the embryonic development [66]. However, no relation with TL has been validated in the literature. Our results show that the total number of vertebrae of *C. fabricii* is not related with TL. It suggests that (1) the segmentation clock speed can vary within a species, (2) the elongation of paraxial mesoderm can vary within a species, or (3) both could vary, and give different total numbers of vertebrae. Also, it is

known that the number of vertebrae is regulated by the segmentation clock and the elongation of paraxial mesoderm [15, 64]. It is also known that the number of vertebrae is impacted by biotic and abiotic factors such as temperature, metabolic rate and life strategy [45, 67, 68]. We suggest that these factors might have an impact on the segmentation clock or on the paraxial mesoderm to change vertebral number.

### **Vertebral column patterning**

Chondrichthyans are the most basal living vertebrates with a complete and complex vertebral column. Among chimaerids, *Callorhinchus milii* shows three regions: synarcual, posterior to synarcual and posterior, owing to the distinction among the small dorsal, interdorsal, and ventral cartilages [72]. The skate *Amblyraja radiata* shows four regions: synarcual, thoracic, lumbar and caudal [5]. According to the literature, sharks have from two to five regions [13, 14, 26–29], thus selachian regionalization is unclear.

Clustering analyses revealed five regions along the antero-posterior body axis of *C. fabricii*. *C. fabricii* has on average 6.73 cervical vertebrae. A small anterior region, such as the cervical region, seems to be preserved across taxa [5, 21, 56, 67, 38–41, 43, 53–55]. Functional properties of the cranial region are associated to cranial support, hydrodynamics and stabilization [21, 49, 73]. Frequently, this region shows vertebral fusion; it reduces the mobility but it offers a biomechanical advantage that increases stability, protection and offers surface for muscle insertion [48]. With an average of 33.36 thoracic vertebrae, *C.*

*fabricii* follows the pattern of a large region to support physiological functions [17]. The lumbar region of *C. fabricii* has on average 5.79 vertebrae surrounded by the pelvic and second dorsal fins. As in tetrapods, it is mainly used for locomotion since it is a region favorable for appendage insertion [17]. Precaudal region, with a diplospondylous state, seems to have a function associated with the undulation of the caudal region. These regions present twice as many vertebrae per segment, thus twice as many vertebral joins, it increases the flexibility of the vertebral column [74]. Finally, the caudal region is functionally associated with propulsion [49]. Anterior expansion of hemal arches might reinforce vertebral connection increasing steadiness and strength. Fusion of neural arches and interdorsals in the caudal region might have the same function. This kind of vertebrae association has already been seen in other organisms. For example, birds show a connection between ribs process [61]. However, when used for predation, as for *Alopias vulpinus*, the caudal region do not tend to fuse but in contrary to gain in flexibility since it presents up to 298 caudal vertebrae [66].

### **Developmental anomalies**

Studies on anatomical anomalies allow one to understand their impact on external morphology, growth and survival [40]. They represent homeostatic mechanism incapacities to balance environmental or genetic stresses [41]. Some anomalies are minor like small deformations but other are major (e.g., lordosis) and occur on numerous vertebrae [44]. Minor anomalies are common along the vertebral column. Fusion, division, addition,

suppression, and malformation [40, 41, 66] were observed but no novel anomaly type was found. Although no major anomaly was found on *C. fabricii*, minor anomalies are fairly abundant and frequent [41, 43]. 89% of specimens had at least one anomaly. Similar ratios were found on *Oncorhynchus mykiss* [41] but *Alosa sapidissima* showed only 34.22% [40] and *Solea senegalensis* showed 44% [43]. On average 2.88 anomalies are found per specimen of *C. fabricii*. In *Danio rerio*, anomaly occurrence increases with a decrease of the number of vertebrae [75]. In *C. fabricii*, there is no correlation between the number of anomalies and the number of vertebrae but one specimen with a particularly low number of vertebrae for its total length presented the highest number of anomalies. Anomaly occurrences increase with age in *Alosa sapidissima* [40, 67]. An absence of correlation or a weak correlation is found between the number of anomalies and TL in *C. fabricii*. It would be interesting to test with a growth series comprising longer specimens.

Anomalies are not distributed randomly along the vertebral column [40]. Their number is important in specific regions [5, 40, 41], distal parts [28] and transitional zones [25]. Lumbar region shows the highest percentage of anomalies (45.38%), whereas the cervical region has the lowest (0.4%). The region corresponding to the transition between monospondylous and diplospondylous vertebrae seems to be the source of most anomalies [5, 40, 41]. Its association with appendage insertion submits this region to muscle stress inducing anomalies. Different species of actinopterygians show anomalies in different vertebral regions. *Oncorhynchus mykiss* shows numerous anomalies in the cephalic region [41]. The cephalic and cervical regions are located at the anterior extremity of the body axis

and represent the most conservative region among taxa showing usually no anomalies [40]. The caudal region seems to show numerous anomalies in osteichthyans suggesting that the notochord flexion could be responsible [43]. Arches are structures with the highest proportion of anomalies in *C. fabricii*, *Oncorhynchus mykiss* [41] and *Alosa sapidissima* [40]. *Pagellus erythrinus* presents anomalies on neural and hemal spines [76]. Anomaly occurrence is higher in distal than proximal structures. Maybe it is because distal parts tend to be smaller and limber [28]. In *C. fabricii*, the average number of vertebrae per region is highly correlated with the number of vertebrae separating the extremities of a region and the presence of anomalies. Then, the likelihood to observe anomalies are higher at the anterior and posterior extremities of a region but, the longer a region is, the higher is the potential to have anomalies further from extremities. Anomaly occurrence in *C. fabricii* is not surprising in comparison to other organisms but it tends to be more important in transitional zones and on distal parts.

### ***Hox* genes**

*Hox* genes are fundamental to embryonic axis specialization by coding for transcription factors involved in regionalization [18–20]. *Hox* genes have restricted expression domains highly correlated with regions [6, 18, 21, 22]. They are acting mainly on serial structures such as vertebrae [20]. Sharks have 34 *Hox* genes grouped in three clusters [20]. Oulion *et al.* [20] showed the expression domains of *Hox* genes but no relation was suggested with vertebral morphology; only two morphological regions were considered for *Scyliorhinus*

*canicula*. Our study shows complementary data with Oulion *et al.*'s hypothesis. Regionalization pattern of *C. fabricii* can be compared with *Hox* gene expression domains observed in *S. canicula* (Figure 9). Among vertebrates, the different *Hox* genes code either for different vertebral regions or different transitions between vertebral regions: *Hox 3* (mouse: anterior member; *S. canicula*: anterior cervical region), *Hox 5* (mouse: cervical and thoracic transition; *S. canicula*: cervical region), *Hox 6* (mouse and *S. canicula*: cervical and thoracic transition), *Hox 9* (mouse: thoracic and lumbar transition; *S. canicula*: thoracic region), *Hox 10* (mouse: lumbar and sacral transition; *S. canicula* and snakes: thoracic and lumbar transition), *Hox 11* (mouse: sacral region; zebrafish: end of precaudal region; *S. canicula*: lumbar region), and *Hox 13* (mouse, zebrafish and *S. canicula*: caudal region) [19–21]. In addition, *Hox 6* has also a role in anterior appendage position [19], whereas *Hox 10* has also a role in rib resorption [77], *Hox 11* has also a role in the transition from monospondylous to diplospondylous conditions of the vertebrae [20]. *Hox* genes seem to have similar patterns of expression along organisms' body axis. It gives a regionalization but codes for various morphological traits. Region variation allows functional diversity and evolvability [19].

*Hox* genes are essentially narrow down to their anterior limit of expression. *Hox* genes present on the posterior part of a region controls vertebral identity. It is called the posterior prevalence [6]. We hypothesize that in *C. fabricii* anomalies occur mainly for two reasons: (1) the overlap between *Hox* genes and (2) the shift between somite and vertebra. Morphological transitions are zones in which most anomalies are found. Since they



correspond to transition between regions, they also correspond to the overlap seen on *Hox* genes on figure 9. Even with posterior prevalence, at least two *Hox* genes code in those transition zones. Furthermore, *Hox* gene expression is linked with somites [64] and somites are associated with two vertebrae [64].

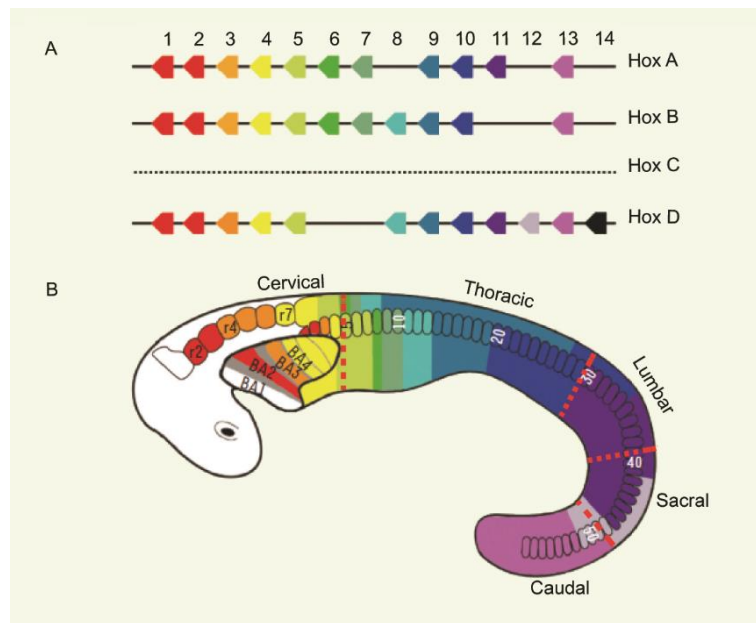


Figure 9: **Regionalization pattern of *C. fabricii* visualized on Oulion *et al.*'s (2012) *Hox* expression diagram of *Scyliorhinus canicula*.** A. *Hox* gene organization in the dogfish. B. Schematic representation of *Hox* gene expression patterns along the anteroposterior axis in the dogfish with corresponding region limits of *C. fabricii* marked with red dashed lines

## Modularity

Regionalization is often associated to modularity [21, 33, 34]. Modularity is strongly suggested in *C. fabricii* vertebral column because regionalization is preserved among individuals and throughout ontogeny. However, some variations lead to transitional zones

meaning some regions are more integrated than others are. *Hox* gene overlap in tetrapods shows different vertebral morphologies and seems to have a role in vertebrae morphological transition [20]. Morphological transition zones are mainly continuous (e.g., switch in ribs insertion, progressive elongation of hemal arcs). Some vertebral structures vary more than others, basiventrals are more diverse than basidorsals [61]. In *C. fabricii*, most morphological transitions occur ventrally showing differences at each transition. This probably explains why anomalies were mostly found ventrally. Transition zones seem to be very large in terms of number of vertebrae compared with studies concerning osteichthyans and tetrapods [5]. Maybe the more basal an organism is, less time it had to specialize, less integrated are the modules. In transitional zones, gradual morphological transitions are associated with anomalies.

### **Identification of critical stages**

The number of chondrified and mineralized elements in *C. fabricii* increase with TL. Chondrification trajectory displays a critical stage between 2.9 and 5 cm TL where five out of the six elements composing a vertebra (except interventrals) are developing. Stabilization around 400 vertebral elements occurs at 5 cm TL. Then, the small variation with respect to the number of elements is caused by different total numbers of vertebrae, the formation of interventrals and the presence of anomalies. The mineralization trajectory has a critical stage at 13.3 cm TL that corresponds to the transition between embryos and juveniles. This transition is also associated with the first embryonic movement to increase

water current around itself in order to facilitate oxygenation [69]. Mechanical stresses from muscles on vertebral joints imply the strengthening of vertebral elements by mineralization [12]. Musa (2018) described different development stages according to the resorption of the vitellus and noticed two resorption periods in the greater spotted catshark (*Scyliorhinus stellaris*): late stage 3 and late stage 6 [70]. Stage 3 of *S. stellaris* corresponds to our smallest specimens of *C. fabricii* during the chondrification critical stage, whereas stage 6 of *S. stellaris* corresponds to specimens of *C. fabricii* close to hatching (our 13-cm TL specimens) during the mineralization critical stage. We suggest that vitellus resorption is then highly linked with skeletogenesis (chondrification and mineralization); however, to our knowledge this has never been documented in other species. Two critical stages were found during the development of *C. fabricii*. The first one being the chondrification of most vertebral elements and the second one being the beginning of mineralization. These critical stages might be congruent with those found in other elasmobranch species. Because of similar developmental trajectories, the thorny skate (*Amblyraja radiata*) [4] shows the same critical stages. Furthermore, because of the possible relation between skeletogenesis and vitellus resorption, the greater spotted catshark and the lesser spotted dogfish (*Squalus acanthias*) [69–71] might also have the same critical stages.

## 1.5 CONCLUSION

The antero-posterior regionalization along the body axis of *C. fabricii* has been investigated based on developmental sequences. Some regions seem more integrated than others do. We highlighted a high variation in posterior regions, particularly in transitional zones, associated with anomaly occurrence. Such variation at the skeletal level should be investigated in other systems such as muscular and nervous systems to understand how modular system interact. For the first time, we hypothesized that regionalization pattern of a shark can be partially explain by *Hox* gene expression and that it is comparable to both *Hox* gene expression and regionalization in tetrapods. This led us to considerer that the presence of five anatomical and developmental regions most likely represent a gnathostome novelty rather than an osteichthyan synapomorphy.

## CONCLUSION GENERALE

Notre étude présente dans un premier temps les stades critiques associés au développement du squelette d'un requin et dans un deuxième temps une caractérisation de la régionalisation au cours de l'ontogénie.

L'analyse de groupement utilisée sur la colonne vertébrale d'un aiguillat noir par Lebel *et al.* (2018) est applicable à l'intégralité d'une série de croissance si elle présente suffisamment de caractères. Notre étude présente l'ontogénie de la régionalisation de *C. fabricii*, le long de son axe antéro-postérieur et révèle la présence de zone de transition entre chaque région. Ces régions semblent être mieux intégrées antérieurement que postérieurement et les zones de transition, correspondant aux chevauchements des limites d'expression des gènes *Hox*, présentent la majorité des anomalies vertébrales. D'ailleurs, il semble que les régions retrouvées chez l'aiguillat noir correspondent au patron d'expression des gènes *Hox* de *S. canicula*, indiquant que non seulement l'expression des gènes *Hox* mais aussi la régionalisation vertébrale est comparable à celle des tétrapodes.

Deux stades critiques ont été découverts lors du développement du squelette chez *C. fabricii*. Ces stades correspondent à la formation de la majorité des éléments cartilagineux en une courte période et à l'apparition de la minéralisation. Il semble que ces stades soient fortement associés avec la résorption puis l'épuisement des ressources énergétiques

présentes sous forme de vitellus. Les stades critiques observés semblent applicables à d'autres élasmobranches.

### **ORIGINALITE DE L'ETUDE**

Cette étude tient son originalité de l'organisme modèle qu'elle utilise, de la quantité de spécimens utilisés pour constituer la série de croissance étudiée mais aussi des sujets étudiés sur ces organismes.

Les études portant sur des séries de croissance de chondrichthyens se basent sur un nombre limité de spécimens [71, 79] ou ne mentionnent pas le nombre de spécimens utilisés [28, 80]. Dans la présente étude, 110 spécimens de *C. fabricii* ont été utilisés grâce à une collaboration avec Pêches et Océans Canada. Une séquence ontogénétique avec un nombre de spécimens important permet une description morphologique et développementale détaillée et l'identification de variation intraspécifique [4].

Les Selachii sont sous-représentés dans les études concernant la modularité. Plus de 82% des études concernent les mammifères, les plantes et les arthropodes [34]. Les études portant sur la modularité focalisent sur le squelette appendiculaire et délaissent donc la colonne vertébrale à l'exception de certaines études traitant des mammifères. L'intérêt de notre étude est qu'elle comble un manque au niveau des connaissances sur la modularité en traitant de la colonne vertébrale d'un requin [34]. D'ailleurs, ces nouvelles connaissances

apportent des informations nécessaires pour comprendre l'apparition de la régionalisation axiale et la présence d'anomalies développementales.

#### **LIMITES DE L'ETUDE**

Cette étude présente toutefois certaines limites au niveau (1) de la position phylogénétique de *C. fabricii*, (2) la terminologie employée, (3) l'utilisation de la longueur totale comme proxy, (4) la méthode de double coloration et (5) la non-vérification de la modularité et de l'intégration.

L'utilisation d'un modèle représentant les conditions basales d'un groupe n'implique pas nécessairement que les conditions observées soient ancestrales mais qu'il y a plus de chances qu'elles soient moins dérivées. L'utilisation d'espèces fossiles devraient idéalement être intégrées dans les arbres phylogénétiques afin d'établir une condition ancestrale propre aux chondrichthyens. La confusion entre les relations phylogénétiques des chondrichthyens actuels et fossiles et la limitation du registre fossile de chondrichthyens rend l'identification de taxons basaux complexe [81, 82].

La terminologie employée pour les structures squelettiques et les régions est très variable selon les espèces et les auteurs. En effet, il est très complexe de savoir qu'elles sont les structures ou régions homologues d'une espèce à l'autre et donc la terminologie est très importante. De plus, la barrière de la langue est non négligeable car le latin a

premièrement été privilégié suivi d'une terminologie propre à chaque langue. Enfin, nous commençons à généraliser les termes autour de l'anglais mais les études plus anciennes ne sont pas pour autant négligeables et un travail d'interprétation est nécessaire.

L'utilisation d'un proxy pour établir une séquence ontogénétique comporte des problèmes liés au proxy lui-même. Les stades de développement correspondent à une variation dans la maturité inter-individuelle alors que les proxys de taille peuvent varier de manière intra-individuelle [4]. Si une corrélation est trouvée entre les stades de développement et le proxy, ce dernier peut être utilisé adéquatement, comme vu chez certains actinoptérygiens [83, 84]. Cependant, *C. fabricii* présente une variation intraspécifique de la taille très importante. La méthode de  $SL_{50}$  a été utilisée pour minimiser la variation développementale. Idéalement il aurait fallu faire une identification du stade de chaque spécimen mais la coloration masquant les caractères déterminant cette identification n'a pas pu se faire *a posteriori*. L'interprétation des résultats a donc été plus sensible.

La coloration des spécimens a été effectuée à différents moments, les premières datant de 2015 et les dernières de 2017. Certains spécimens sont endommagés, d'autres présentent une coloration diffuse rendant les observations difficiles. Nos analyses sont donc dépendantes de l'état des spécimens. Les explications possibles de la coloration diffuse sont le temps réduit d'exposition aux colorants, une exposition trop forte aux rayons UV ou au glycérol (R. Cloutier, comm. pers.) et une transition de la composition chimique durant les phases de développement. Effectivement, avant la chondrification puis avant la



minéralisation des phases de condensation correspondent à une transition chimique empêchant la fixation des colorants [51, 52]. Il est donc nécessaire que l'observateur soit formé pour distinguer non seulement les différents colorants mais aussi les différentes textures.

## **PUBLICATION**

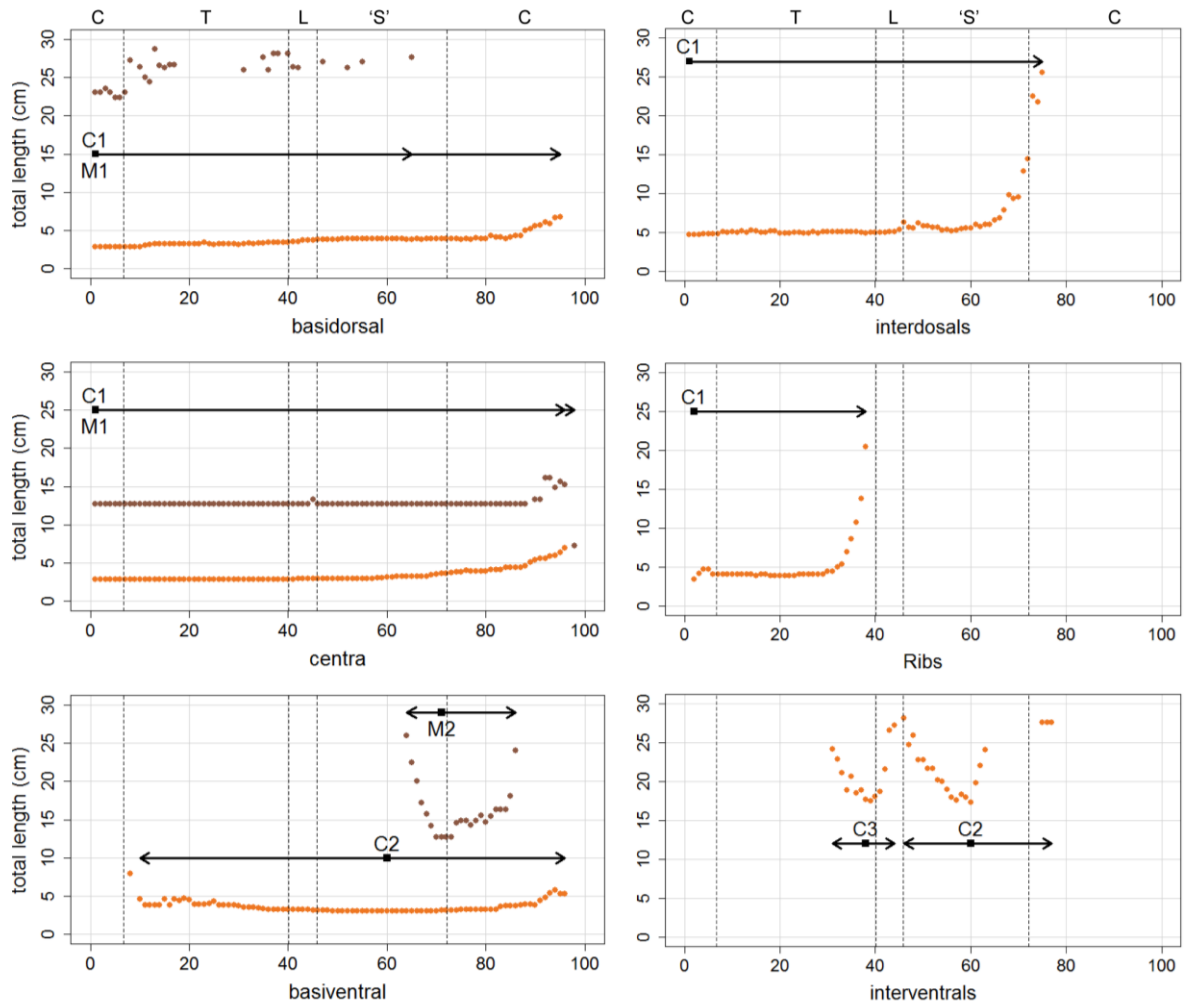
L'article sera soumis durant l'hiver 2020 au journal *BMC Biology*. En premier auteur, j'ai choisi l'idée originale du projet, élaboré les méthodes d'analyses, réalisé les observations, analyses et interprétation, en collaboration avec mon directeur. Richard Cloutier, mon directeur et dernier auteur était, en plus, responsable de la logistique du labo et de la révision de l'article. Cyrena Riley, responsable de la disponibilité des spécimens étudiés et de la formation au C&S, est la 2ème auteure. Les auteurs Margot Angibaud, Cyrena Riley et Richard Cloutier ont décidé de nommer l'article « Shark vertebral skeleton: regionalization, anomalies and critical stages of the Black Dogfish (*Centroscyllium fabricii*, Elasmobranchii) »

## **PERSPECTIVES**

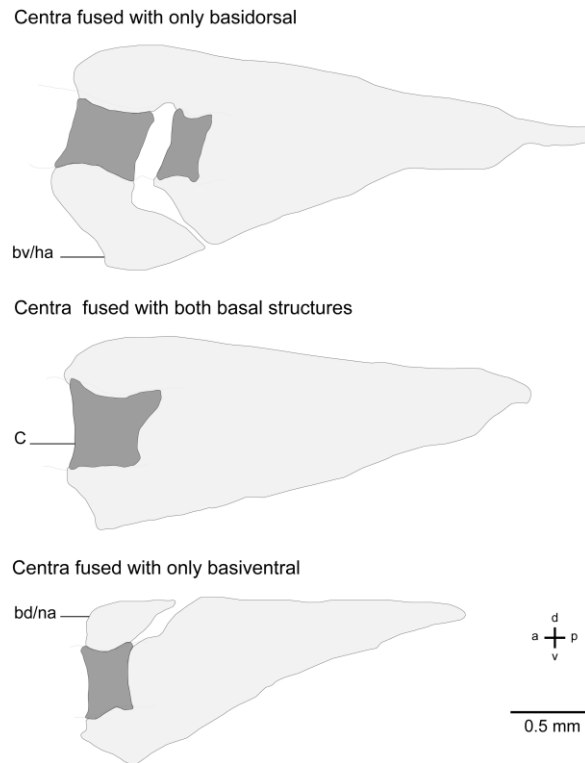
Avec notre étude, il devient intéressant de comparer la régionalisation trouvée sur l'aiguillat noir avec celle d'autres Selachii pour comprendre comment la régionalisation peut varier en fonction de l'écologie (différents niveaux trophiques, différents environnements, différents modes de reproduction). Il serait aussi intéressant d'observer si

d'autres systèmes, comme le système musculaire ou nerveux, suivent le même patron de régionalisation que le système squelettique. Enfin, il est important de comprendre pourquoi et comment la régionalisation vertébrale évoluent. Nous pensons que la régionalisation est liée avec l'insertion des appendices locomoteurs, comme l'insertion des nageoires chez les poissons et celle des membres chez les tétrapodes. Ces insertions impliquent des stress qui devraient façonner la morphologie vertébrale pour optimiser l'organisation des systèmes.

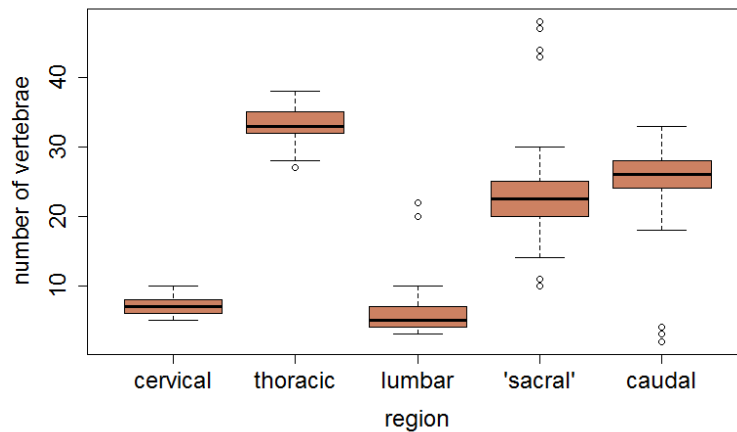
## ANNEXES



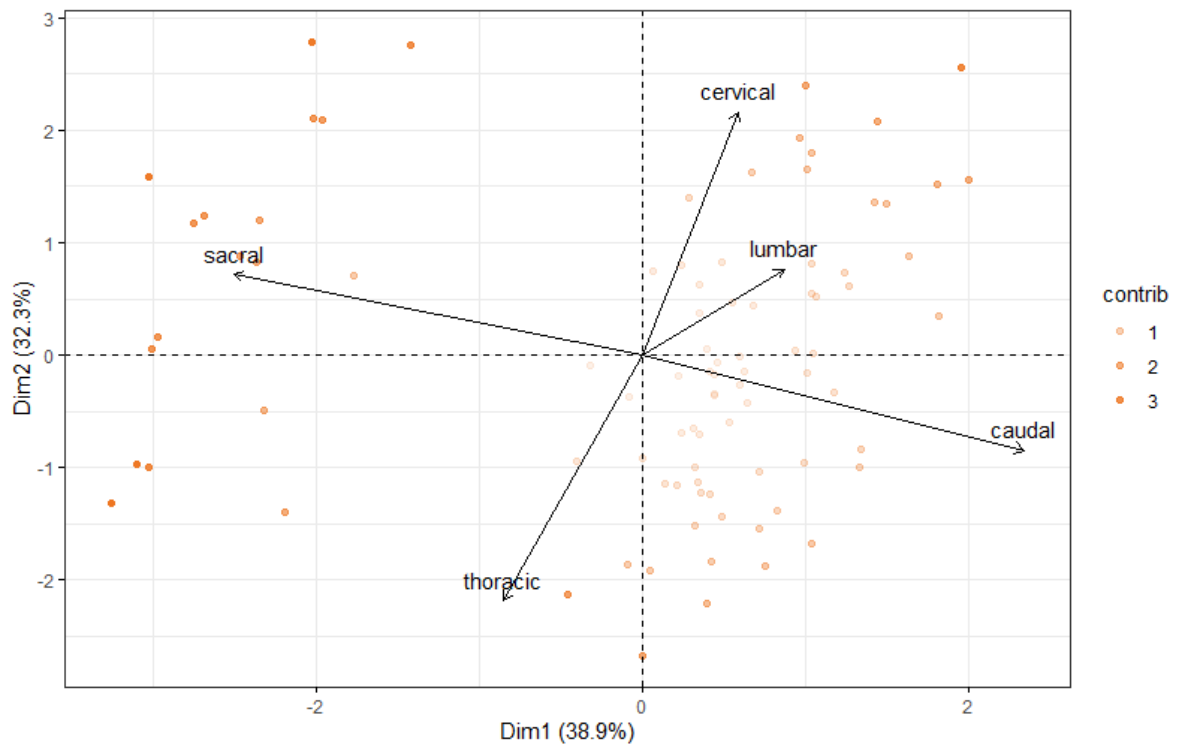
**Annex I: Chondrification (orange) and mineralization (brown) of vertebral elements according to total length (cm).** Square dot correspond to center of chondrification (C) and mineralization (M) in order of apparition (1, 2 and 3). Arrows correspond to direction of chondrification and mineralization. Dashed lines correspond to transition between regions. C, cervical; T, thoracic; L, lumbar; 'S', sacral; C, caudal



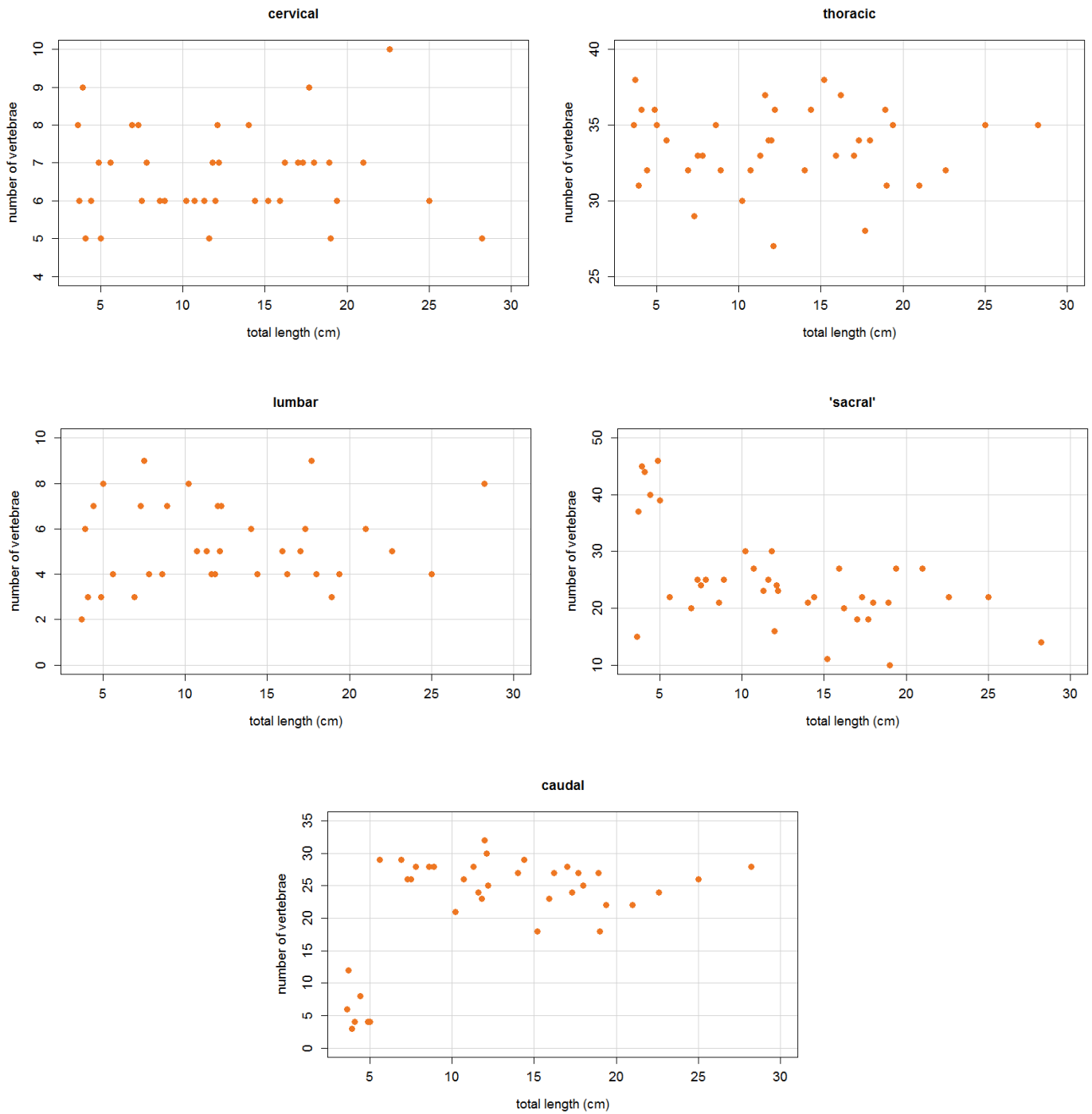
**Annex II: Morphological types of the last caudal vertebra in *C. fabricii*.** Bd/na. basidorsal/neural arch, bv/ha. basiventral/hemal arch, c. centra; a, anterior; p, posterior; d, dorsal; v, ventral



**Annex III: Boxplot of number of vertebrae per regions in *C. fabricii*.** Blod black horizontal lines correspond to median, orange box correspond to limit of upper and lower quartile, thin vertical black lines to whiskers and dots to exteme values



**Annex IV: PCA showing relation of the number of vertebrae and regions in *C. fabricii*.** Axis percentages correspond to the percentage of variation explained by axes 1 and 2. Color variation corresponds to contribution concerning arrow representation. Arrows correspond to qualification and quantification of relation between regions



**Annex V: Number of vertebrae according to total length per region in *C. fabricii*.** Each graph corresponds to a region. Each dot corresponds to a specimen.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Larouche O, Zelditch ML, Cloutier R. Fin modules: an evolutionary perspective on appendage disparity in basal vertebrates. *BMC Biol.* 2017;15:e32. doi:10.1186/s12915-017-0370-x.
2. Weigmann S. Annotated checklist of the living sharks, batoids and chimaeras (Chondrichthyes) of the world, with a focus on biogeographical diversity. *J Fish Biol.* 2016;88:837–1037.
3. Wourms JP, Demski LS. The reproduction and development of sharks, skates rays and ratfishes: introduction, history, overview, and future-prospects. *Environ Biol Fishes.* 1993;38:7–21.
4. Riley C. Patrons de développement de l'endosquelette (chondrification et minéralisation chez deux espèces de chondrichthyens actuels : perspectives évo-dévo des gnathostomes. Thèse de Ph.D., Université du Québec à Rimouski; 2016.
5. Berio F. Finding regions in the vertebral column of the thorny skate (*Amblyraja radiata*). Mémoire de M.Sc., 2019.
6. Iimura T, Denans N, Pourquoi O. Establishment of Hox vertebral identities in the embryonic spine precursors. *Curr Top Dev Biol.* 2009;88:201–234.
7. Zhang G. Evolution of Vertebrate Cartilage Development. University of Florida; 2007.
8. Seidel R. Calcified cartilage or bone? Collagens in the tessellated endoskeletons of cartilaginous fish (sharks and rays). *J Struct Biol.* 2017;200:54–71.
9. Morel C. Etude de la squelettogenèse chez la lamproie marine (*Petromyzon marinus*). Mémoire de M.Sc., Université du Québec à Rimouski; 2014.
10. Hall BK, Miyake T, Centre LS, Scotia N. The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. *Anat Embryol.* 1992;186:107–124.
11. Bordat C. Les cartilages calcifiés de la petite roussette (*Scyliorhinus canicula* L., Chondrichthyens) : histologie et ultrastructure. *Can J Zool.* 1988;66:1432–1445.
12. Dean MN, Ekstrom L, Monson-Orran E, Ballantyne J, Witten PE, Riley C, Habraken W, Omelon S. Mineral homeostasis and regulation of mineralization processes in the skeletons of sharks, rays and relatives (Elasmobranchii). *Semin Cell Dev Biol.* 2015;46:51–67. doi:10.1016/j.semcdb.2015.10.022.



13. Dean MN, Summers AP. Mineralized cartilage in the skeleton of chondrichthyan fishes. *Zoology*. 2006;109:164–168.
14. Lebel E. Chondrification et minéralisation du squelette postcranien de l'aiguillat noir (*Centroscyllium fabricii*) du golfe du Saint-Laurent. Mémoire de M.Sc., Université du Québec à Rimouski.
15. Ward AB, Brainerd EL. Evolution of axial patterning in elongate fishes. *Biol J Linn Soc*. 2007;90:97–116.
16. Flower WH, Gadow H. *An Introduction to the Osteology of the Mammalia*. 3rd edition. London: Macmillan and co; 1885.
17. Jones KE, Angielczyk KD, Polly PD, Head JJ, Fernandez V, Lungmus JK, Tulga S, Pierce SE. Fossils reveal the complex evolutionary history of the mammalian regionalized spine. *Science*. 2018;361:1249–1252.
18. Pascual-anaya J, Sato I, Sugahara F, Higuchi S, Paps J. Hagfish and lamprey *Hox* genes reveal conservation of temporal colinearity in vertebrates. *Nat Ecol Evol*. 2018;2:859–866.
19. Burke AC, Nelson CE, Morgan BA, Tabin C. *Hox* genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development*. 1995;121:333–46. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7768176](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=7768176).
20. Oulion S, Laurenti P, Casane D. Organisation des gènes *Hox*. *m/s*. 2012;28:350–353. doi:10.1051/medsci/2012284005.
21. Sallan LC. Tetrapod-like axial regionalization in an early ray-finned fish. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2012;279:3264–3271. doi:10.1098/rspb.2012.0784.
22. Prince VE, Price AL, Ho RK. *Hox* gene expression reveals regionalization along the anteroposterior axis of the zebrafish notochord. *Dev Genes Evol*. 1998;208:517–522.
23. Gaunt SJ. The significance of *Hox* gene collinearity. *Int J Dev Biol*. 2015;59:159–170. doi:10.1387/ijdb.150223sg.
24. Oulion S, Borday-Birraux V, Debais-Thibaud M, Mazan S, Laurenti P, Casane D. Evolution of repeated structures along the body axis of jawed vertebrates, insights from the *Scyliorhinus canicula Hox* code. *Evol Dev*. 2011;13:247–259.
25. Alexander T, Nolte C, Krumlauf R. *Hox* genes and segmentation of the hindbrain and axial skeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2009;25:431–456.
26. Shirai S, Okamura O. Anatomy of *Trigonognathus kabeyai*, with comments on feeding mechanism and phylogenetic relationships (Elasmobranchii, Squalidae). *Japanese J Ichthyol*. 1992;39:139–150.

27. Campagno LJ V., Hamlett WC. Endoskeleton. In: Sharks, Skates, and Rays: The Biology of Elasmobranch Fishes. JHU Press. Baltimore; 1999. p. 69–90.
28. Claeson KM, Dean MN. Cartilaginous fish skeletal anatomy. *Encycl Fish Physiol from Genome to Environ*. W. C. Hamlett. 2011;1:419–427. doi:10.1016/B978-0-12-374553-8.00241-0.
29. Daniel JF. *The Elasmobranch Fishes*. Berkeley; 1934.
30. Gadow H, Abbott EC. On the evolution of the vertebral column of fishes. *Philos Trans R Soc London B*. 1894;186:163–221.
31. Moreira RA, Gomes UL, Carvalho MRDE. Systematic implications of the caudal fin skeletal anatomy in ground sharks, order Carcharhiniformes (Chondrichthyes: Elasmobranchii). *Zool J Linn Soc*. 2018;1–19.
32. Figueiredo Petean F, Carvalho MR. Comparative morphology and systematics of the cookiecutter sharks, genus *Isistius* Gill (1864) (Chondrichthyes: Squaliformes: Dalatiidae). *PLoS One*. 2018;13:e0201913.
33. Wagner GP, Pavlicev M, Cheverud JM. The road to modularity. *Nat Rev Genet*. 2007;8:921–931.
34. Esteve-altava B. In search of morphological modules: A systematic review. *Biol Rev*. 2016;1–16.
35. Wagner GP, Mezey J, Calabretta R. Natural selection and the origin of modules. In: Callebaut W, Rasskin-Gutman D, editors. *Modularity, Understanding the development and evolution of natural complex systems*. London: The MIT Press; 2005. 33–47.
36. Raff RA. *The shape of life - genes, development, and the evolution of animal form*. Chicago; 1996.
37. Clune J, Mouret J-B, Lipson H. The evolutionary origins of modularity. *Proc R Soc B*. 2012;280:1–9. doi:10.1098/rspb.2012.2863.
38. Hautier L, Weisbecker V, Sánchez-villagra MR, Goswami A, Asher RJ. Skeletal development in sloths and the evolution of mammalian vertebral patterning. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107:18903–18908.
39. Buchholtz EA, Wayrynen KL, Lin IW. Breaking constraint: Axial patterning in *Trichechus* (Mammalia: Sirenia). *Evol Dev*. 2014;16:382–393.
40. Gao X, Liu Z, Huang CG Bin, Jia BLY, Wang ZGY, Hong GXL. Skeletal development and abnormalities of the vertebral column and fins in larval stage of hatchery-reared American shad, *Alosa sapidissima*. *Aquaculture*. 2018;49:2376–2392.

41. Boglione C, Pulcini D, Scardi M, Palamara E, Russo T, Cataudella S. Skeletal anomaly monitoring in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) reared under different conditions. *PLoS One*. 2014;9:e17.
42. Witten PE, Gil-martens L, Hall BK, Huysseune A, Obach A. Compressed vertebrae in Atlantic salmon *Salmo salar*: evidence for metaplastic chondrogenesis as a skeletogenic response late in ontogeny. *Dis Aquat Organ*. 2005;64:237–246.
43. Gavaia PJ, Dinis MT, Cancela ML. Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*. 2002;211:305–323.
44. Laith J, Liu J. First record of vertebral anomalies in some members of the genus *Pampus* (family: Stromateidae) collected from Guangdong, China and from the Kii Peninsula, Honshu Island, Japan. *Mar Biodivers Rec*. 2015;8:1–4.
45. Lindsey CC. Pleomerism, the widespread tendency among related fish species for vertebral number to be correlated with maximum body length. *J Fish Res Board Can*. 1975;32:2453–2469.
46. Nelson JS, Grande TC, Wilson MVH. *Fishes of the World*. Fifth. Hoboken; 2016.
47. Maxwell EE, Wilson LAB. Regionalization of the axial skeleton in the “ambush predator” guild - Are there developmental rules underlying body shape evolution in ray-finned fishes? *BMC Evol Biol*. 2013;13:1–17.
48. Vanburen CS, Evans DC. Evolution and function of anterior cervical vertebral fusion in tetrapods. *Biol Rev*. 2016;:1–19.
49. Bebej RM. Functional morphology of the vertebral column in *Remingtonocetus* (Mammalia, Cetacea) and the evolution of aquatic locomotion in early archaeocetes. Ph.D. Thesis, University of Michigan; 2011.
50. Chevrinais M, Johanson Z, Trinajstić K, Long J, Morel C, Renaud CB. Evolution of vertebrate postcranial complexity: Axial skeleton regionalization and paired appendages in a devonian jawless fish. *Palaeontology*. 2018;61:1–13.
51. Ota KG, Fujimoto S, Oisi Y, Kuratani S. Late development of hagfish vertebral elements. *J Exp Zool Part B Mol Dev Evol*. 2013;320:129–139.
52. Leprévost A, Azaïs T, Trichet M, Sire JY. Vertebral development and ossification in the siberian sturgeon (*Acipenser baerii*), with new insights on bone histology and ultrastructure of vertebral elements and scutes. *Anat Rec*. 2017;300:437–449.
53. Jawad LA, Al-Hassani L, Al-Kharusi LH. On the morphology of the vertebral column of the frigate tuna, *Auxis thazard* (Lacepedea, 1800) (family: Scombridae) collected from the sea of Oman. *Acta Mus Nat Pragae, Ser B Hist Nat*. 2013;69:101–105.

54. Bensimon-Brito A, Cardeira J, Cancela M, Huysseune A, Witten P. Distinct patterns of notochord mineralization in zebrafish coincide with the localization of osteocalcin isoform 1 during early vertebral centra formation. *BMC Dev Biol.* 2012;12:28. doi:10.1186/1471-213X-12-28.
55. Jawad LA, Al-Hassanp L, Al-Kind A. Vertebral column morphology of the bengal snapper, *lutjanus bengalensis* (Bloch, 1790), from the Oman sea. *Cah Biol Mar.* 2014;55:491–497.
56. De Clercq A, Perrott MR, Davie PS, Preece MA, Wybourne B, Ruff N, et al. Vertebral column regionalisation in Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *J Anat.* 2017;231:1–15.
57. Libert E. Etude de la morphologie et de la squelettogenèse chez le thon rouge d'Atlantique (*Thunnus thynnus*), élevé en captivité. Mémoire de M.Sc., Université du Québec à Rimouski; 2015.
58. Maia A, Wilga CA. Dorsal fin function in spiny dogfish during steady swimming. *J Zool.* 2015;298:139–149.
59. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9:676–682.
60. Hervé M. RVAideMemoire: Testing and plotting procedures for biostatistics. R Package Version 0.9-69. Available online at <http://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire>. 2018.
61. Owen FRS. *The Archetype and Homologies of the Vertebrate Skeleton.* London; 1847.
62. Arratia G, Schultze H, Casciotta J. Vertebral column and associated elements in dipnoans and comparison with other fishes: Development and homology. *J Morphol.* 2001;172:101–172.
63. Criswell KE, Coates MI, Gillis JA. Embryonic origin of the gnathostome vertebral skeleton. *Proc R Soc B.* 2017;284:1–7.
64. Ward L, Evans SE, Stern CD. A resegmentation-shift model for vertebral patterning. *J Anat.* 2017;230:290–296.
65. Müller J, Scheyer TM, Head JJ, Barrett PM, Ericson PGP, Pol D, et al. Homeotic effects, somitogenesis and the evolution of vertebral numbers in recent and fossil amniotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:2118–2123.
66. Springer GV, Garrick JAF. A survey of vertebral numbers in sharks. *Proc United States Natl Museum.* 1964;116:73–96.
67. Asher RJ, Lin KH, Kardjilov N, Hautier L. Variability and constraint in the mammalian

- vertebral column. *J Evol Biol.* 2011;24:1080–1090.
68. Lindell ALE, Ecology SF, Dec N. The evolution of vertebral number and body size in snakes. *Funct Ecol.* 1994;8:708–719. <https://www.jstor.org/stable/2390230>.
69. Ballard WW, Mellinger J, Lechenault H. A series of normal stages for development of *Scyliorhinus canicula*, the lesser spotted dogfish (Chondrichthyes: Scyliorhinidae). *J Exp Zool.* 1993;267:318–336.
70. Musa SM, Czachur M V, Shiels HA. Oviparous elasmobranch development inside the egg case in 7 key stages. *PLoS One.* 2018;13:1–29.
71. Enault S, Adnet S, Debiais-Thibaud M. Skeletogenesis during the late embryonic development of the catshark *Scyliorhinus canicula* (Chondrichthyes; Neoselachii). *MorphoMuseumM.* 2016;1:e2.
72. Didier AD. Phylogenetic systematics of extant chimaeroid fishes (Holocephali, Chimaeroidei). *Am Museum Novit.* 1995;88.
73. Criswell KE, Coates MI, Gillis JA. Embryonic development of the axial column in the little skate, *Leucoraja erinacea*. *J Morphol.* 2017;00:1–21.
74. Symmons S. Notochordal and elastic components of the axial skeleton of fishes and their functions in locomotion. *Zool Soc London.* 1979;189:157–206.
75. Morin-kensicki EM, Melancon E, Eisen JS. Segmental relationship between somites and vertebral column in zebrafish. *Development.* 2002;129:3851–3860.
76. Sfakianakis DG, Koumoundouros G, Divanach P, Kentouri M. Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L . 1758). Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities. *Aquaculture.* 2004;232:407–424.
77. Guerreiro I, Nunes A, Woltering JM, Casaca A, Nóvoa A, Vinagre T, et al. Role of a polymorphism in a *Hox* / *Pax*-responsive enhancer in the evolution of the vertebrate spine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:10682–10686. doi:10.1073/pnas.1300592110.
78. Miller RF, Cloutier R, Turner S. The oldest articulated chondrichthyan from the Early Devonian period. *Nature.* 2003;425:501–504.
79. Claeson KM, Hilger A. Morphology of the anterior vertebral region in elasmobranchs: special focus, Squatiniformes. *Foss Rec.* 2011;14:129–140.
80. Eames BF, Allen N, Young J, Kaplan A, Helms JA, Schneider RA. Skeletogenesis in the swell shark *Cephaloscyllium ventriosum*. *J Anat.* 2007;210:542–554.
81. Long JA, Burrow CJ, Ginter M, Maisey JG, Trinajstić KM, Coates MI, et al. First shark

from the Late Devonian (Frasnian) Gogo Formation, Western Australia sheds new light on the development of tessellated calcified cartilage. *PLoS One*. 2015;10:1–24. doi:10.1371/journal.pone.0126066.

82. Chevrinais M, Sire J-Y, Cloutier R. Unravelling the ontogeny of a Devonian early gnathostome, the “acanthodian” *Triazeugacanthus affinis* (eastern Canada). *PeerJ*. 2017;5:e3969. doi:10.7717/peerj.3969.

83. Cloutier R, Souza JL De, Browman HI. Early ontogeny of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* head. *J Fish Biol*. 2011;78:1035–1053.

84. Crotwell PL, Mabee PM. Gene expression patterns underlying proximal-distal skeletal segmentation in late-stage zebrafish, *Danio rerio*. *Dev Dyn*. 2007;236:3111–3128.



