

# THESE

Présentée à

**L'UNIVERSITE DU HAVRE**

En vue de l'obtention du grade de

**DOCTEUR**

*Spécialité* : Biologie des organismes

---

**MOTILITE CELLULAIRE ET IMMUNOCOMPETENCE  
DES HEMOCYTES DE *MYTILUS EDULIS*  
-APPLICATIONS AUX DIAGNOSTICS ENVIRONNEMENTAUX.**

---

Par

**Damien RIOULT**

Soutenue le 7 novembre 2013 devant un jury composé de :

M. Michel AUFFRET	Professeur à l'université de Brest	Rapporteur
M. Stéphane BETOULLE	Maître de conférences à l'université de Reims	Rapporteur
M. Matthieu MARIN	Maître de conférences à l'université de Lille	Examineur
M. Jean-Marc LEBEL	Professeur à l'université de Caen	Examineur
M. Frank LE FOLL	Professeur à l'université du Havre	Examineur

**Thèse co-dirigée par :  
Pr Frank LE FOLL et Pr Jean-Marc LEBEL**

**Laboratoire d'Ecotoxicologie -Milieux  
Aquatiques (LEMA), UPRES EA-3222  
Université du Havre**

**Biologie des Mollusques marins et des  
Ecosystèmes Associés (BioMEA)  
CNRS INEE - FRE3484  
Université de Caen**





A mes Grands Pères,  
A mon Père,  
A mon Fils...



Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au Laboratoire d'Ecotoxicologie – Milieux aquatiques (LEMA) de l'université du Havre dirigé par le professeur Christophe Minier.

Mon travail de thèse a été financé par une allocation doctorale de 3 ans de la région Haute Normandie. Durant ces 3 années j'ai également pu bénéficier d'une mission enseignement à l'université du Havre (64h annuelles). Durant la dernière année de thèse, j'ai exercé la fonction d'ATER à 50%.

Ce travail a également bénéficié de l'aide généreuse de divers organismes:

- La fédération de recherche SCALE, Sciences Appliqués à L'Environnement.
- L'Association pour le Développement de la Recherche en Ecotoxicologie – Science de la Santé et de l'Environnement (ADRESSE)



## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à témoigner toute ma reconnaissance aux membres du jury.

Merci à M. Michel AUFFRET, Professeur à l'université de Brest et à M. Stéphane BETOULLE, Maître de conférences à l'université de Reims, d'avoir accepté de rapporter mon travail de thèse, vos remarques et suggestions me permettront d'améliorer ce manuscrit.

Je tiens à remercier M. Matthieu MARIN, Maître de conférences à l'université de Lille, d'avoir accepté de juger ce travail. Mes travaux sont la suite directe de ceux initiés au laboratoire lors de son doctorat.

Merci à Jean-Marc LEBEL, Professeur à l'université de Caen, d'avoir accepté de co-encadrer cette thèse. Merci également aux membres de son équipe pour leur accueil lors de ma visite au laboratoire de Biologie des Mollusques marins et des Ecosystèmes Associés ainsi que pour les discussions partagées autour de ce travail.

Merci à mon directeur de Thèse, le Professeur Frank LE FOLL de m'avoir accordé sa confiance pendant ces quelques années (de la licence au doctorat). Il a su m'orienter dans mon travail, répondre à mes nombreuses interrogations et enfin partager avec moi sa grande culture biologique, scientifique et générale. Je le remercie d'avoir pris en compte mes réflexions et de m'avoir laissé la liberté de mener les plus pertinentes jusqu'au bout.

Je tiens à remercier le Professeur émérite François LEBOULENGER ainsi que le Professeur Christophe MINIER, directeurs successifs du Laboratoire d'Ecotoxicologie Milieu Aquatique, de m'avoir accueilli dans leur structure.

Je n'oublierai pas mon ancienne collègue et amie Jennifer PASQUIER, pour son aide scientifique et personnelle, pour m'avoir fait participer à ses réflexions scientifiques et avoir pris part aux miennes. Je ne saurai que lui dire merci pour les discussions, parfois mouvementées, que nous avons partagées.

Je désire exprimer ma reconnaissance à ceux qui m'ont accompagné pendant cette thèse, et particulièrement aux enseignant-chercheurs, aux personnels techniques et administratifs du LEMA, présents ou passés. Ce fut un immense plaisir pour moi de travailler dans ce laboratoire.

Je profite de ces quelques lignes pour remercier très sincèrement mes parents, pour leur présence tout au long de ces années. Soyez fiers d'avoir été des parents exemplaires. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Un grand merci à ma famille et belle-famille qui m'ont toujours soutenu, m'encourageant toujours à aller plus loin malgré les difficultés et les sacrifices.

Merci à mon frère et à mon père pour les pêches aux moules souvent bien matinales.

Merci enfin à mon épouse, Audrey, de m'accompagner au quotidien aussi bien dans les bons moments que dans l'adversité. Je te suis reconnaissant des sacrifices que tu as faits pour moi. Merci de me montrer chaque jour ton amour. La naissance de notre fils en est la plus belle preuve.



Vous trouverez ci-joint dans l'enveloppe ci-dessous une carte USB qui reprend les différents éléments de ce manuscrit :

- une version numérique
- les articles scientifiques publiés, soumis ou en préparation
- les données additionnelles – vidéos publiées en ligne avec les articles



## Articles scientifiques publiés, soumis ou en préparation

- **Article 1**

Le Foll, F., **Riout, D.**, Boussa, S., Pasquier, J., Dagher, Z., Leboulenger, F., 2010. Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. *Fish Shellfish Immunol* **28** (2), 372-386.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.011>

- **Article 2**

**Riout, D.**, Le Foll, F., Lebel, J.-M., 2013. Cell tracking and velocimetric parameters analysis as an approach to assess activity of mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes in vitro. *Cytotechnology*. **65** (5), 749–758.

doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10616-013-9558-2>

- **Article 3**

**Riout, D.**, Pasquier, J., Boulangé-Leconte, C., Poret, A. Abbas, I., Marin, M., Minier, C. and Le Foll, F., 2013. The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of *Mytilus edulis* is mediated by an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally inducible in eosinophilic granulocytes. *Aquatic Toxicology*, In press.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.012>

- **Article 4**

Riout, D. Peden R., Dagher Z., Bultelle F., Lebel J-M. and Le Foll F. ABCC/MRP transporter activity and temperature regulate kinetic of mussel hemocytes migration *En préparation*.

- **Article 5**

Pasquier, J., Galas, L., Boulange-Lecomte, C., **Riout, D.**, Bultelle, F., Magal, P., Webb, G., Le Foll, F., 2012. Different modalities of intercellular membrane exchanges mediate cell-to-cell p-glycoprotein transfers in MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* **287**, 7374-7387.

doi: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.312157>

- **Article 6**

Pasquier, J., **Riout, D.**, Abu-Kaoud, N., Marie, S., Rafii, A., Guerrouahen, B., Le Foll, F., 2013. P-glycoprotein-activity measurements in multidrug resistant cell lines: single-cell versus single-well populational fluorescence methods. *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 676845, 11 pages.

doi : <http://dx.doi.org/10.1155/2013/676845>

## Données additionnelles – vidéos publiées en ligne avec les articles

- **Vidéos associées à l'article 1**

1. cellule ressemblant à un granulocyte éosinophile
2. cellule ressemblant à un basophile
3. cellule ressemblant à un hyalinocyte
4. comparaison éosinophile/basophile
5. basophile près d'un éosinophile
6. basophile sur une cellule étalée
7. agrégat de basophiles
8. dissociation en culture d'un agrégat
9. changement rapide de morphologie d'un hémocyte
10. changement rapide de morphologie d'un autre hémocyte
11. cell-tracking en contraste d'hoffman – culture dense

- **Vidéos associées à l'article 2**

12. étalement des hémocytes à la mise en culture
13. "A la Saint-Michel tout le monde dé-mé-nage"
14. activité motile des hémocytes aussitôt après la mise en culture
15. activité motile des hémocytes 4 jours après la mise en culture – granulocytes éosinophiles désignés en bleu et basophiles en rouge
16. tracking des noyaux au Hoechst 33342 – exemple 1
17. tracking des noyaux au Hoechst 33342 – exemple 2

- **Vidéos associées à l'article 3**

18. Vidéo confocale d'un hémocyte en contraste de phase et noyau marqué au Hoechst 33342
19. Même vidéo que précédemment, marquage avec un anticorps monoclonal UIC2 conjugué à la phycoérythrine (PE)

- **Vidéos associées à l'article 4 (en préparation)**

20. tracking des noyaux au Hoechst 33423 – imagerie confocale
21. tracking et trajectoire en épifluorescence avec Metamorph
22. Stacking d'images confocales d'un agrégat – Contraste de phase/Hoechst
23. Stacking 3D confocal – même agrégat que précédent – Hoechst
24. Stacking 3D confocal – basophile sur éosinophile – WGA/Hoechst
25. effet de la température sur la motilité hémocytaire

- **Vidéos associées à l'article 5**

26. reconstitution 3D de TnT entre cellules tumorales MCF-7
27. Stacking d'images confocales de TnT entre MCF-7 marquées WGA



# RESUME

La moule bleue *Mytilus edulis* est un mollusque bivalve filtreur et sessile, commun en baie de Seine et, au-delà, sur le littoral de la Manche. Cet organisme présente un intérêt majeur d'une part en conchyliculture et d'autre part dans de nombreux programmes de surveillance environnementale comme espèce indicatrice du niveau de contamination par les xénobiotiques ou par certains pathogènes microbiologiques. Les moules sont dotées d'un système vasculaire non endigué dans lequel circule des cellules clés de l'immunité, les hémocytes en suspension dans l'hémolymphe.

Dans une première partie, ce manuscrit propose une revue de la compréhension actuelle des mécanismes de l'immunité exclusivement innée des invertébrés, en s'attachant plus particulièrement au rôle prévalent des hémocytes chez *Mytilus*. Ces cellules immunocompétentes sont notamment responsables de la reconnaissance des pathogènes, des activités phagocytaires et cytotoxiques, et de la sécrétion des peptides antimicrobiens.

Dans la partie expérimentale, un effort a d'abord été mené afin de proposer une meilleure caractérisation des populations et des activités hémocytaires. A partir de colorations cytologiques classiques combinées à la cytométrie en flux et au volume Coulter ainsi que d'une caractérisation originale des motilités cellulaires par vidéomicroscopie d'intervalle (time-lapse), nos résultats proposent une description des activités et des interactions d'au moins trois sous-populations hémocytaires : les basophiles, les hyalinocytes et les granulocytes éosinophiles. La vitesse de migration des hémocytes a été mesurée *in vitro* par une nouvelle méthode, le tracking des noyaux marqués au Hoechst 33342. Cette approche complète les techniques traditionnelles utilisées pour évaluer la réponse immunitaire en ajoutant une activité biologique essentielle : la migration tissulaire des immunocytes. Les données obtenues permettent de proposer des applications dans le cadre des réponses aux stress environnementaux comme l'accroissement des températures, la contamination par les micro-organismes pathogènes ou la présence dans l'eau d'immunomodulateurs ou d'immunotoxiques.

Le second axe développé consiste en une analyse du phénotype de *Multi Xenobiotic Resistance* (MXR) au sein des sous-populations hémocytaires identifiées en cytométrie en flux. Les résultats indiquent que les hémocytes expriment les transcrits correspondant aux ABC transporteurs de type B et C, ainsi que des protéines ABCB. L'utilisation de bloqueurs pharmacologiques montre une activité d'efflux principalement liée aux protéines ABCC/MRP, bloquées par le MK571 et essentiellement exprimées par les granulocytes éosinophiles. Le MXR activity factor est augmenté dans les cellules prélevées à partir de moules collectées dans des moulières plus contaminées par les polychlorobiphényles et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (données IFREMER).

Enfin, nous montrons que, comme dans les cellules de l'immunité des vertébrés, les transporteurs ABCC/MRP sont directement impliqués dans la migration des hémocytes en culture. L'exposition au MK571 interrompt complètement la migration cellulaire. Le rôle de ces transporteurs dans le phénotype MXR et/ou dans la libération de médiateurs de la chimiokinèse ou de la chimiotaxie est discuté.

En conclusion, nos résultats permettent de proposer une classification des sous-populations hémocytaires de *Mytilus edulis* en intégrant pour la première fois la motilité dans le phénotype des cellules. L'approche par tracking permet de quantifier les activités migratoires de ces cellules ainsi que leurs perturbations, notamment par les stress environnementaux. Ce travail indique également que les transporteurs ABCC/MRP régulent la motilité des cellules, ce qui ouvre des perspectives importantes en termes de biologie de l'immunité et d'évaluation de l'immunocompétence de ces animaux.

**AUTRES MOTS-CLES :** migration cellulaire, immunité innée, MXR, transporteurs ABC,  
cytométrie en flux, vidéomicroscopie



# SOMMAIRE

AVANT-PROPOS .....	1
INTRODUCTION.....	5
Chapitre 1. L'immunité exclusivement innée des invertébrés.....	9
I. Les mécanismes de l'immunité innée à médiation cellulaire .....	12
A. Reconnaissance des pathogènes : PAMPs et PRRs.....	12
B. Phagocytose .....	15
C. Action cytotoxique par production de ROS et RNS.....	18
II. Molécules et mécanismes de l'immunité innée humorale.....	21
D. L'agglutination par les lectines et les FREPs.....	21
E. Les inhibiteurs de protéases.....	23
F. Le Système ProPhénolOxydases et la mélanisation .....	24
G. La coagulation hémostatique.....	25
H. Le Lysosome .....	27
I. Les peptides antimicrobiens (AMPs).....	28
III. Connaissances actuelles de l'immunité innée des bivalves.....	29
A. Reconnaissance des pathogènes : PAMPs et PRRs.....	32
B. Phagocytose .....	33
C. Action cytotoxique, production de ERO et ERN .....	33
D. Agglutination par les lectines et les FREPs.....	35
E. Les inhibiteurs de protéase .....	36
F. Le système ProPhénolOxydase.....	37
G. La coagulation hémostatique.....	37
H. Le lysozyme .....	38
I. Les peptides antimicrobiens.....	38
J. Le système du complément .....	41
IV. Immuno-modulation chez <i>Mytilus edulis</i> .....	43
A. Challenges bactériens .....	43
B. Modulations abiotiques.....	44
V. Les différents types d'hémocytes et leur origine.....	46
Chapitre 2. Les fonctions hémocytaires .....	51
I. Motilité et migration tissulaire.....	51
A. La polarisation.....	53
B. La protrusion membranaire .....	56
C. L'adhésion .....	59
D. Translocation et rétractation.....	60
E. Motilité des immunocytes.....	62
II. La résistance multixénobiotique MDR/MXR.....	63
A. Les acteurs moléculaires .....	66
B. Allocrites et inhibiteurs des transporteurs ABCB et ABCC.....	69
C. Le phénotype MXR chez les bivalves .....	73
D. Données concernant les régulations géniques des acteurs MDR/MXR.....	75
E. Régulations du phénotype MXR chez les bivalves.....	78
OBJECTIFS DE LA THESE .....	81
MATERIELS ET METHODES .....	83
Chapitre 1. <i>Mytilus edulis</i> .....	83
I. Généralités sur les mollusques et les bivalves .....	83
II. Le genre <i>Mytilus</i> .....	84



III. Le système hémolympatique .....	85
IV. Répartition géographique, habitat et écophysiologie .....	86
Chapitre 2. La cytométrie en flux .....	89
I. La fluidique .....	89
II. L'illumination et l'optique .....	91
III. La mesure du volume .....	94
IV. Le conditionnement du signal .....	96
Chapitre 3. Imagerie .....	97
I. Equipement .....	97
II. Le tracking cellulaire .....	98
Chapitre 4. Culture Hémocytaire .....	99
RESULTATS .....	101
Article 1 .....	103
Characterisation of <i>Mytilus edulis</i> hemocyte subpopulation by single cell time-lapse motility imaging .....	103
Article 2 .....	121
Cell tracking and velocimetric parameters analysis as an approach to assess activity of mussel ( <i>Mytilus edulis</i> ) hemocytes in vitro. ....	121
Article 3 .....	133
The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of <i>Mytilus edulis</i> is mediated by an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally inducible in eosinophilic granulocytes. ....	133
Article 4 .....	147
ABC/MRP transporter activity and temperature regulate kinetic of mussel hemocytes migration .....	147
DISCUSSION .....	163
I Les différents types d'hémocytes (ARTICLE 1) .....	164
II. Motilité en culture (ARTICLE 2 et 4) .....	170
B. Comportement des hémocytes à la mise en culture .....	170
C. Décours temporel de l'activité hémocytaire <i>in vitro</i> .....	172
D. Régulation de la vitesse de déplacement des hémocytes .....	173
III. MXR et ABC transporteurs (ARTICLE 3) .....	178
A. Activité basale d'efflux .....	178
B. Effets de la contamination chimique de l'environnement et capacité d'efflux des différents hémocytes .....	181
IV. MXR et motilité (ARTICLE 4) .....	183
CONCLUSION & PERSPECTIVES .....	187
BIBLIOGRAPHIE .....	189
ANNEXES 229	
Article 5 .....	231
Different modalities of intercellular membrane exchanges mediate cell-to-cell p-glycoprotein transfers in mcf-7 breast cancer cells. ....	231
Article 6 .....	247
P-glycoprotein-activity measurements in multidrug resistant cell lines: single-cell <i>versus</i> single-well populational fluorescence methods .....	247

## TABLE DES FIGURES

Figure 1. Les deux immunités. ....	6
Figure 2. Phylogénie simplifiée de l'immunité.....	8
Figure 3. Représentation schématique du système immunitaire : l'innée « drive » l'acquis chez les vertébrés .....	10
Figure 4. Les mécanismes innés de défense.....	11
Figure 5. Différents modes de reconnaissances d'un pathogène menant à la phagocytose. ....	17
Figure 6. Les trois principales activités enzymatiques du système d'attaque radicalaire des phagocytes.....	20
Figure 7. Le système Prophénoloxydase.....	25
Figure 8. Le processus de coagulation chez les Arthropodes.....	27
Figure 9. La production de ROS par les cellules phagocytaires. ....	34
Figure 10. Les trois voies du système du complément.....	42
Figure 11. Différentes classifications des hémocytes chez <i>Mytilus edulis</i> et <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	47
Figure 12. Différentes phases de motilité cellulaire.....	52
Figure 13. Les quatre classes de chimiokines chez les vertébrés.....	54
Figure 14. Chimiotactie et haptotactie .....	55
Figure 15. Les différents modes de protrusion membranaire.....	57
Figure 16. Voies de signalisation de la polarité cellulaire et du chimiotactisme.....	58
Figure 17. Localisation des adhérences sur une cellule en migration.....	60
Figure 18. Répartition des forces lors de l'embrayage moléculaire.....	61
Figure 19. Les différentes phases de détoxification cellulaire.....	64
Figure 20. Structure générale des transporteurs ABC.....	66
Figure 21. Fonctionnement de l'aspirateur hydrophobe et des flipp/flopp/sramblase.....	68
Figure 22. Exemples de composés allocrites de la classe des ABCB/ P-gp.....	70
Figure 23. Liste non exhaustive de différents allocrites et inhibiteurs de la classe ABCC/MRP.....	71
Figure 24. Allocrites, inhibiteurs et inducteurs de la P-glycoprotéine.....	72
Figure 25. Structure des transporteurs ABC chez <i>Mytilus californianus</i> .....	74
Figure 26. Induction des acteurs de détoxification cellulaire par les récepteurs nucléaires partenaires de RXR.....	78
Figure 27. Système circulatoire de la moule bleue <i>Mytilus edulis</i> .....	86
Figure 28. Répartition géographique de plusieurs espèces de bivalves.....	87
Figure 29. Schéma de la Flow-Cell du Cell Lab Quanta et des forces mises en jeu.....	90
Figure 30. Trajets optiques du Cell Lab Qanta.....	91
Figure 31. Principe de mesure de la complexité cellulaire .....	92
Figure 32. Principe de fonctionnement des photo-détecteurs.....	93
Figure 33. Mesure de la taille des particules en cytométrie.....	95
Figure 34. Poste d'imagerie dynamique cellule.....	98
Figure 35. Distribution des sous populations hémocytaires dans les cytogrammes FSC/SS selon Garcia-Garcia <i>et al.</i> , 2008.....	166
Figure 36. Modèle expliquant la répartition des hémocytes de <i>Mytilus edulis</i> en cytométrie en flux.....	167
Figure 37. Comparaison des acteurs moléculaires chez l'amibe et le neutrophile.....	174
Figure 38. Effets synergiques des UV et du Hoechst 33342.....	175
Figure 39. Rôle des transporteurs ABC dans les hémocytes de <i>Mytilus edulis</i> .....	186

## TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Liste non exhaustive de quelques PRRs avec les PAMPs associés.....	13
Tableau 2. Récapitulatif des ROS et RNS les plus couramment rencontrés.....	18
Tableau 3. Les peptides antimicrobiens chez <i>Mytilus sp.</i> ....	40
Tableau 4. Effets de différents xénobiotiques sur les fonctions hématocytaires. ....	45
Tableau 5. Principales études portant sur le phénotype MXR dans les hématocytes de <i>Mytilus edulis</i> .....	75

## ABREVIATIONS

<b>2-AAF</b> :	2 acétylamino fluorène	<b>LXR</b> :	Liver X Receptor
<b>ABC</b> :	ATP Binding Cassette	<b>MAC</b> :	Complexe d'Attaque Membranaire
<b>ADN</b> :	Acide Désoxyribo Nucléique	<b>MCF-7</b> :	Michigan Cancer Foundation – 7
<b>ADNc</b> :	ADN complémentaire	<b>MDR</b> :	Multi Drug Resistance
<b>AMP</b> :	AntiMicrobial Peptides	<b>MED</b> :	Multiple start site Element DownStream
<b>ARN</b> :	Acide Ribo Nucléique	<b>MEF-1</b> :	MDR1 promoter-Enhancing Factor 1
<b>ARNi</b> :	ARN interférant	<b>MPO</b> :	Mylopéroxydase
<b>ATP</b> :	Adénosine Tyrosine Phosphate	<b>MRP</b> :	Multidrug Resistance Protein 1
<b>BCRP</b> :	Breast Cancer Resistance Protein	<b>MITT</b> :	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide
<b>C'/TEP</b> :	C3-Factor B/ThioEster-containing Protein	<b>MXR</b> :	Multi Xenobiotic Resistance
<b>CAM</b> :	Calcéine AcétoxyMéthylester	<b>NBD</b> :	Nucleotide Binding Domain
<b>CAR</b> :	Constitutive Adrostane Receptor	<b>NCB</b> :	Nanosized Carbon Black
<b>CAT</b> :	Catalase	<b>NF-κB</b> :	Nuclear Factor-Kappa B
<b>CD</b> :	Clusters de Différenciation	<b>NK</b> :	Natural Killer
<b>CDC</b> :	Cell Division Control protein	<b>NK-L</b> :	Natural Killer Like
<b>CMH</b> :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	<b>NLR</b> :	NOD like receptor
<b>CRD</b> :	domaines de reconnaissance des glucides	<b>NNRTI</b> :	Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors
<b>CYP</b> :	Cytochrome à P450	<b>NOD</b> :	Nucleotide Oligomerization Domain
<b>DAMP</b> :	Damage-Associated Molecular Pattern ou Danger-Associated Molecular Pattern	<b>NOx</b> :	NADPH oxydase
<b>DMSO</b> :	Diméthylsulfoxyde	<b>PAMP</b> :	Pathogen-Associated Molecular Pattern
<b>Dscam</b> :	Down syndrome cell adhesion molecule	<b>PCB</b> :	PolyChloroBiphényle
<b>DTT</b> :	Dithiothréitol	<b>P-gp</b> :	Permeability glycoprotein
<b>E2</b> :	17β-estradiol	<b>PGRP</b> :	Peptidoglycan recognition proteins
<b>ELR</b> :	Acide glutamique-Leucine-Arginine	<b>PI 3K</b> :	Phosphatidylinositol 3-Kinase
<b>ESL1</b> :	E-selectin ligand 1	<b>PKC</b> :	Protéine Kinase C
<b>EST</b> :	Expressed Sequence Tags	<b>PMT</b> :	Photomultiplicateur
<b>EV</b> :	Electronique Volume	<b>PO</b> :	PhénolOxydase
<b>FL</b> :	Fluorescence	<b>PPAR</b> :	Peroxisomal Proliferator Activated Receptor
<b>fMLP</b> :	N-formyl-Methionine-Leucine-Phénylalanine	<b>ProPO</b> :	ProPhenolOxidase
<b>FREP</b> :	Fibrinogen-Related Protein	<b>Pro-ppA</b> :	ProPO activation enzymes
<b>FSC</b> :	Forward Scater	<b>PRR</b> :	Pattern Recognition Receptors
<b>FuHC</b> :	Fusion Histocompatibilité	<b>PSGL1</b> :	P-selectin glycoprotein ligand 1
<b>FXR</b> :	Farsenoid X Receptor	<b>PtdIns(3,4)P2</b> :	Phosphatidylinositol-3,4 diphosphate
<b>GMPC</b> :	Guanosine MonoPhosphate cyclique	<b>PtdIns(3,4,5)P3</b> :	Phosphatidylinositol-3,4,5 triphosphate
<b>GNBP</b> :	Gram-negative binding proteins	<b>PTEN</b> :	Phosphatase and TENsin homolog
<b>GPx</b> :	Glutathion peroxidase	<b>PXR</b> :	Pregnane X Receptor
<b>GRd</b> :	Glutathion réductase	<b>RAG</b> :	Recombination Activating Gene
<b>GSH</b> :	Gluthation	<b>RIG</b> :	Retinoic Acid-Inducible Gene
<b>GST</b> :	Gluthation S Transferase	<b>RLR</b> :	RIG-like receptors
<b>GTP</b> :	Guanosine TriPhosphate	<b>RNS ou ERN</b> :	Reactive Nitrogen Species
<b>HAP</b> :	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique	<b>ROCK</b> :	Rho-associated protein kinase
<b>HIF-1</b> :	Hypoxia-Inducible Factor-1	<b>ROS ou ERO</b> :	Reactive Oxygen species
<b>HPA</b> :	Helis pomatia Agglutinin	<b>RT-PCR</b> :	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
<b>HSE</b> :	Heat Shock Element	<b>RXR</b> :	Retinoid X receptor
<b>HSF</b> :	Heat Shock Factor	<b>SOD</b> :	SuperOxyde Dismutase
<b>HSP</b> :	Heat Shock Protein	<b>SSC ou SC</b> :	Side Scater
<b>Ig</b> :	Immunoglobuline	<b>SVF</b> :	Sérum de Veau Foetal
<b>IgSF</b> :	Immunoglobulin SuperFamily	<b>SXR</b> :	Steroid and Xenobiotic Receptor
<b>IL</b> :	InterLeukine	<b>TcR</b> :	T cell Receptor
<b>LBP</b> :	LPS-binding protein		
<b>LPS</b> :	Lipopolysaccharide		
<b>LRR</b> :	Leucine-Rich Repeat		

**TEM :** Transverse Electromagnétique Mode  
**TGF :** Tumor Growth Factor  
**Tim :** Timeless  
**TIMP :** Inhibiteurs tissulaires de  
Métalloprotéinases  
**TLR :** Toll-Like Receptors  
**TNF :** Tumor necrosis Factor  
**TPA:** Tetragonolobus purpureas Agglutinin  
**UCP:** Uncoupling Protein  
**UDP-GST:** UDP-glucuronyltransferase  
**UV :** UltraViolet  
**VCR:** Vincristine  
**vCRL1:** variable Complement Receptor-Like 1  
**VRL :** Variable Lymphocyte Receptor  
**VRP :** Vérapamil  
**WASP :** Proteine du syndromes de Wiskott-Aldrich  
**WAVE :** WASP family verpolin homologue (SCAR)  
**WB:** Western Blot  
**WGA :** Wheat Germ Agglutinin  
**βGBP:** β-1-3 glucan binding proteins



# AVANT-PROPOS

---

"La diversification des formes de vie depuis plus de 3 milliards d'années a conduit au développement de dialogues variés entre les êtres vivants. Les attaques virulentes des pathogènes sont un type particulier d'interaction auxquelles les hôtes répondent par des défenses efficaces. Le maintien de l'intégrité immunitaire des individus est un moteur de l'évolution"

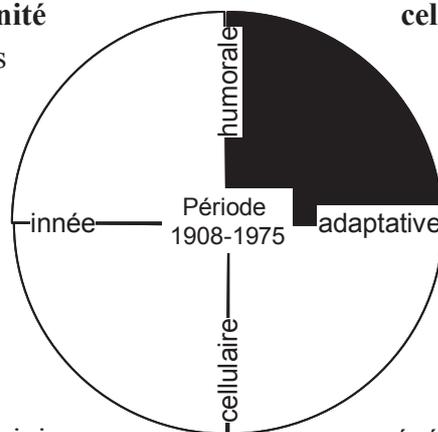
[Jules Hoffman prix Nobel de Médecine - Physiologie 2011]

## Compendium

*Les avancées conceptuelles à propos des mécanismes de l'immunité*

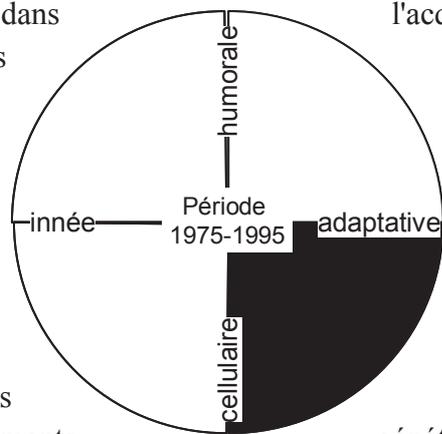
En 1908, le Prix Nobel de médecine/physiologie est attribué au biologiste allemand Paul Ehrlich pour ses travaux sur les **interactions antigènes/anticorps** et au biologiste ukrainien naturalisé français Elie Metchnikoff pour sa théorie sur la **phagocytose**. Elie Metchnikoff a découvert la phagocytose en observant, par **transparence**, l'accumulation de **cellules motiles** autour de corps étrangers (des éclats de verre) insérés dans des larves **d'invertébrés marins**, des étoiles de mer, collectées sur le littoral scandinave.

Le choix de ces deux co-lauréats est révélateur de l'opposition qui règne parmi les immunologistes en ce début de XX<sup>ème</sup> siècle. Pour Metchnikoff, l'élimination des microbes repose sur **l'immunité cellulaire** grâce à l'action des phagocytes que sont les macrophages (Metchnikoff, 1908) ; pour Ehrlich, les anticorps sont les acteurs d'une **immunité humorale** principalement **humorale**. Par la suite et pendant une longue période, le poids historique de la sérologie et les formidables découvertes concernant la spécificité des interactions antigène/anticorps (Landsteiner, 1945), la structure des immunoglobulines (Edelman, Yahara *et al.*, 1973; Porter, 1973) et l'origine génétique de leur diversité (Tonegawa, 1983) ont largement dominé l'immunologie qui a vu élucidés la plupart des mécanismes reposant sur la **composante humorale et adaptative** de la défense contre les pathogènes.



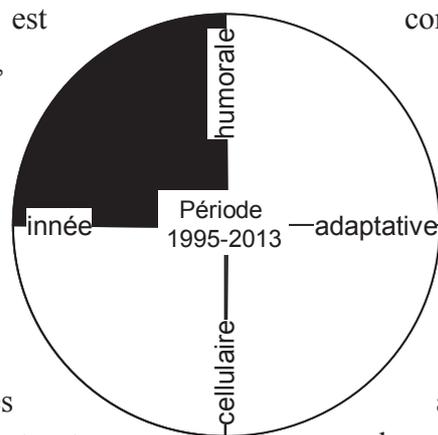
A l'issue de cette période, le balancier immunologique est revenu dans le camp des adeptes d'une médiation cellulaire des mécanismes immuns. En effet, avec l'hypothèse de la sélection et de l'organisation clonale des lymphocytes (Jerne, 1955; Burnet, 1976), l'immunité adaptative devenait centrée sur la problématique des **interactions cellule-cellule**, à l'origine de la **distinction du soi et du non-soi**. A l'appui de ce cadre théorique expliquant les

phénomènes de tolérance ou de rejet des greffes (Medawar, 1961), la découverte du rôle du thymus dans la maturation des lymphocytes T (Miller, 1961) puis de la fonction du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) comme domaine de "restriction de reconnaissance de l'antigène " et enfin dans l'élimination des clones auto-réactifs (Zinkernagel & Doherty, 1974) constituent des avancées conceptuelles essentielles pour la compréhension de la physiologie de l'immunité. Finalement, les travaux de cette époque culminent avec les résultats indiquant que l'énorme répertoire des récepteurs T pour l'antigène (TcR) est formé, exactement comme pour les immunoglobulines, par le réarrangement de segments génétiques en mosaïque (Kappler, Kubo *et al.*, 1983) et avec l'introduction du concept de **synapses immunologiques** (Grakoui, Bromley *et al.*, 1999) regroupant les acteurs des **interactions entre cellules de l'immunité adaptative**. Il convient de noter ici que les trois ensembles de gènes très particuliers à l'origine des immunoglobulines, du CMH et du TcR sont l'apanage des seuls Vertébrés et que la quasi-totalité des résultats dans ce domaine ont été obtenus sur des modèles murins.



l'acquisition de la notion de soi par auto-réactifs (Zinkernagel & Doherty, 1974) constituent des avancées essentielles pour la physiologie de l'immunité. Finalement, les travaux de cette époque indiquent que des récepteurs T pour l'antigène (TcR) sont formés, exactement comme les immunoglobulines, par le réarrangement de segments génétiques en mosaïque (Kappler, Kubo *et al.*, 1983) et avec l'introduction du concept de **synapses immunologiques** (Grakoui, Bromley *et al.*, 1999) regroupant les acteurs des **interactions entre cellules de l'immunité adaptative**. Il convient de noter ici que les trois ensembles de gènes très particuliers à l'origine des immunoglobulines, du CMH et du TcR sont l'apanage des seuls Vertébrés et que la quasi-totalité des résultats dans ce domaine ont été obtenus sur des modèles murins.

La fin de cette époque voit également revenir une conception plus physiologique de l'immunité qui consiste à considérer que la propriété fondamentale du système immunitaire n'est pas de différencier le soi du non-soi mais bien de répondre aux **agents infectieux** (Fougereau, 2007). Cette acception implique que **l'immunogénicité** (faculté d'induire une réponse immunitaire) est **distincte de l'antigénicité** (propriété d'un antigène reconnu par un anticorps). Cette distinction est connue depuis longtemps dans la pratique vaccinale. En effet, les immunologistes ne se contentent pas d'injecter un antigène pour obtenir une réponse immunitaire. Ils font appel à des **solutions adjuvantes**, dont le mode d'action est mystérieux. C'est ce que Janeway appelle "le sale petit secret des adjuvantes de certaines substances". La découverte des propriétés adjuvantes de certaines substances remonte à 1925 et est due à un biologiste de l'Institut Pasteur formé à l'école vétérinaire d'Alfort, Gaston Ramon (Ramon, 1955). La composition des adjuvants est très variable mais non peptidique, incluant par exemple des sels d'aluminium, des émulsions huile-dans-l'eau, des dérivés des lipopolysaccharides membranaires de bactéries Gram-négatives ou des oligodésoxynucléotides riches en dimères CpG (Bégué, Girard *et al.*, 2012). L'énigme de **la réponse immune sans antigène** trouve une réponse moléculaire soudaine en 1996 avec la découverte, par l'équipe de Jules Hoffmann de l'Université de Strasbourg, d'une voie de signalisation spécifique de la lutte contre les

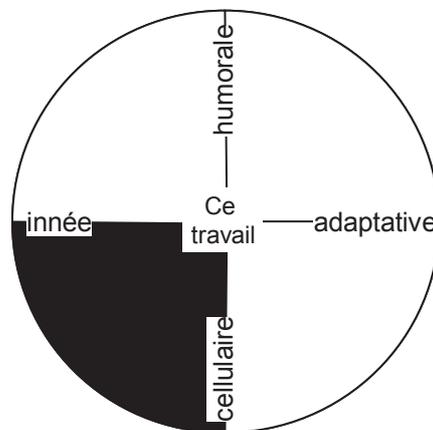


connue depuis longtemps dans la pratique vaccinale. En effet, les immunologistes ne se contentent pas d'injecter un antigène pour obtenir une réponse immunitaire. Ils font appel à des **solutions adjuvantes**, dont le mode d'action est mystérieux. C'est ce que Janeway appelle "le sale petit secret des adjuvantes de certaines substances". La découverte des propriétés adjuvantes de certaines substances remonte à 1925 et est due à un biologiste de l'Institut Pasteur formé à l'école vétérinaire d'Alfort, Gaston Ramon (Ramon, 1955). La composition des adjuvants est très variable mais non peptidique, incluant par exemple des sels d'aluminium, des émulsions huile-dans-l'eau, des dérivés des lipopolysaccharides membranaires de bactéries Gram-négatives ou des oligodésoxynucléotides riches en dimères CpG (Bégué, Girard *et al.*, 2012). L'énigme de **la réponse immune sans antigène** trouve une réponse moléculaire soudaine en 1996 avec la découverte, par l'équipe de Jules Hoffmann de l'Université de Strasbourg, d'une voie de signalisation spécifique de la lutte contre les

mycoses chez la *Drosophile* (Lemaitre, Nicolas *et al.*, 1996). Cette voie trouve son origine dans un récepteur membranaire du nom de *Toll*, jusque-là connu pour son rôle dans le développement embryonnaire, mais qui est activé par des **motifs moléculaires de pathogènes** fongiques chez l'adulte. Très vite, il apparaît que les *Drosophiles* peuvent **sélectivement** mettre en jeu des voies *Toll* pour produire soit des **peptides antifongiques** ou soit des **peptides antibactériens**, en fonction de l'agent infectieux (Lemaitre, Reichhart *et al.*, 1997). Pour la première fois, un récepteur responsable de la reconnaissance de pathogènes dans un **organisme invertébré à immunité exclusivement innée** était identifié. Un homologue humain de *Toll* est caractérisé dans la foulée (Medzhitov, Preston-Hurlburt *et al.*, 1997), conduisant en quelques années à la définition de la famille des **TLR** pour *Toll-like receptors* (revue par (Aderem & Ulevitch, 2000)). Dans le même temps, l'intérêt pour les peptides antibactériens est allé grandissant (pour revues (Ganz, 2003; Brogden, 2005)).

Ce bond mécaniste en entraîne un autre : il supporte le rôle **régulateur ou co-stimulateur**, cher à Medzhitov et Janeway, du système immunitaire inné sur le système adaptatif. En effet, puisque les immunoglobulines et les TcR sont générés par réarrangement aléatoire de gènes, ils peuvent potentiellement être produits contre n'importe quel antigène du non-soi – ce qui n'est pas le cas. Une des principales fonctions du système immunitaire inné des Vertébrés est donc de **renseigner** les lymphocytes sur la nature des antigènes, **inoffensifs ou dangereux**, contre lesquels l'immunité adaptative pourrait développer une réponse spécifique (Medzhitov & Janeway, 1998a). Le système immunitaire inné trie les antigènes qui viennent des pathogènes et ceci parce qu'il répond exclusivement aux "**structures moléculaires**" provenant des microbes. Ces structures moléculaires distinctes des antigènes ont été baptisées **PAMPS** pour *pathogen-associated molecular patterns* et les récepteurs activés par ces motifs, à l'instar des TLR, ont reçu le nom de **PRR** pour *pattern recognition receptors* (Medzhitov & Janeway, 1998b).

Chez les invertébrés, la réponse immune repose exclusivement sur l'immunité innée médiée par les hémocytes, de la reconnaissance sans antigène des envahisseurs dangereux à leur destruction. L'hémocyte fait tout (Nappi & Christensen, 2005).





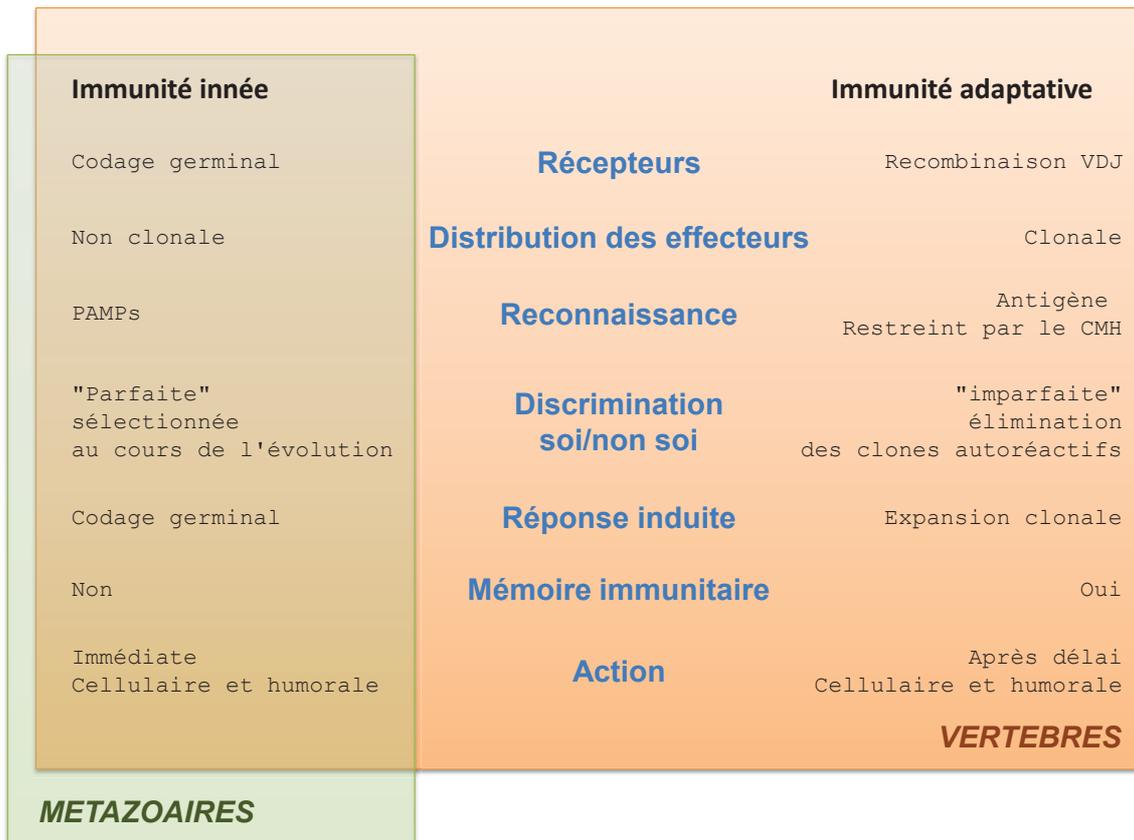
# ***INTRODUCTION***

---

Les invertébrés forment un ensemble non monophylétique d'organismes, dans lequel on rangeait anciennement par exemple les Cnidaires, les Echinodermes et l'amphioxus (Lecointre & Bonnet, 2008). Ce regroupement d'espèces au sein des invertébrés, fait référence à la taxonomie traditionnelle qui repose sur l'identification de caractères observables permettant de créer des taxons, c'est à dire des ensembles qui se distinguent par la présence (ou l'absence) de ces caractères biologiques, physiologiques ou phénotypiques – ici tous les métazoaires sans vertèbres. Cette méthode de classification est abandonnée.

La systématique propose, de nos jours, une classification phylogénétique qui organise les êtres vivants selon un rationnel évolutif, identifiant les ascendances communes à partir de caractères innovants (ou synapomorphies). Seuls les taxons monophylétiques, groupes incluant un ancêtre unique et tous ses descendants, sont pris en compte (Lecointre, Guyader *et al.*, 2006). Au sens strict des phylogénéticiens, les invertébrés forment un vaste groupe paraphylétique, qui ne peut donc pas faire l'objet d'études comme un tout. Cependant, la délimitation des champs disciplinaires, ou des espèces d'intérêt, en biologie fait encore largement appel à la notion d'organismes apparentés à des invertébrés. Pour preuves, certains travaux cités dans ce manuscrit sont des publications récentes de journaux scientifiques comme *Invertebrate Survival Journal* ou *Journal of Invertebrate Pathology*.

Le clivage entre invertébrés et vertébrés trouve une autre justification lorsqu'on s'intéresse plus spécifiquement à l'immunité : il permet, en première approximation, de tracer une ligne (Flajnik & Du Pasquier, 2004) entre les organismes dotés d'une immunité exclusivement innée d'une part, c'est-à-dire figée dans le génome germinale, et d'autre part les animaux qui, de surcroît, acquièrent une défense adaptée aux pathogènes effectivement rencontrés au cours de leur existence, sélectionnant et conservant des clones de lymphocytes, avec l'unique capacité de reconnaître un antigène spécifique et de proliférer en sa présence (**Figure 1**).



**Figure 1. Les deux immunités.**

Principales caractéristiques distinguant l'immunité innée de l'immunité adaptative. Tous les métazoaires ont une immunité innée. Les vertébrés bénéficient d'une double immunité. CMH, complexe majeur d'histocompatibilité ; PAMPs, Pathogen Associated Molecular Patterns. D'après (Janeway & Medzhitov, 2002).

Les immunologistes s'accordent pour associer l'apparition de l'immunité adaptative avec l'intégration, il y a plus de 500 millions d'années, d'un élément microbien transposable RAG (*Recombination Activating Gene*) dans des gènes codant pour des protéines de la famille des immunoglobulines, Igs (Agrawal, Eastman *et al.*, 1998). Cette « innovation » est à l'origine des réarrangements de segments d'acides nucléiques de ces gènes, les segments VDJ, générateurs des domaines hypervariables des Immunoglobulines (Igs) et du récepteur des lymphocytes T (TcR), eux-mêmes à l'origine du répertoire clonal des lymphocytes. En corollaire est apparue la double nécessité de présenter les antigènes dans l'environnement du « soi » au sein de synapses immunologiques, – on parle alors de restriction par le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), – et d'éliminer les clones autoréactifs, ces deux mécanismes conduisant à la distinction du « soi » et du « non-soi ». Il en résulte des possibilités d'expansion clonale permettant à la fois une forte amplification des activités de défense après amorçage (« priming ») par les pathogènes et l'instauration d'une mémoire

immunitaire. Cette spécificité de la réponse se fait au prix d'un retard, parfois fatal, de la réponse à la ré-exposition et parfois aussi de l'apparition de nouvelles pathologies auto-immunes en cas d'élimination imparfaite des cellules activées par le « soi ». En outre, il est généralement admis que les vraies tumeurs avec métastases et les cancers agressifs sont associés à l'immunité adaptative, les néoplasies étant très rares et bien plus bénignes chez les invertébrés (Robert, 2010). Les analyses génomiques ont montré que *i*) les séquences RAG n'existent pas chez les animaux dérivés d'ancêtres plus anciens que les chondrichthyens et *ii*) que tous les gnathostomes sont capables d'effectuer des recombinaisons au niveau des gènes codant pour les Igs et le TcR grâce à ce mécanisme (Bernstein, Schluter *et al.*, 1996; Azumi, Santis *et al.*, 2003). Il convient également de noter que les organismes à immunité adaptative bénéficient en fait d'une double immunité puisqu'ils conservent la plupart des mécanismes et quasiment toutes les voies de signalisation de l'immunité innée (Salzet, 2001)

Le dogme central en termes d'évolution du système immunitaire est donc qu'en l'absence de « vrais » lymphocytes et d'anticorps, les non vertébrés ont une réponse immunitaire purement innée, c'est-à-dire non spécifique – (Rowley & Powell, 2007). Pourtant, certains travaux chez l'amphioxus ont révélé une diversité des gènes IgSF (Immunoglobuline SuperFamily), avec, de plus, des combinaisons spécifiques à chaque individu (Cannon, Haire *et al.*, 2004). En outre, des réponses apparemment accélérées après ré-exposition à des micro-organismes pathogènes, amorçages parfois transmissibles de la génération parentale à la descendance, ont été décrites chez des insectes et des crustacés (Little, O'Connor *et al.*, 2003; Moret, 2006). De façon à priori surprenante, des travaux maintenant anciens indiquent que les lombrics rejettent les allogreffes (Cooper & Roch, 1986). Si on ajoute à cela l'incroyable diversité des molécules de défense chez l'oursin (Smith, Rast *et al.*, 2006), ainsi que la sécrétion de protéines apparentées au fibrinogène (FREPs, *fibrinogen-related proteins*) qui ciblent les parasites et qui sont codés par une vaste famille de gènes hypervariables, via des mutations somatiques, un épissage alternatif et l'action de convertases, notamment chez les mollusques (Zhang, Adema *et al.*, 2004), il semble que la frontière séparant les deux immunités devienne finalement moins nette (Flajnik & Du Pasquier, 2004). Un examen approfondi des molécules de l'immunité et des mécanismes générateurs de diversité moléculaire dans le monde vivant (**Figure 2**), laisse entrevoir une vaste combinatoire de stratégies moléculaires qui pourrait être à l'origine de ce que certains auteurs désignent comme une immunité "quasi-spécifique" chez de nombreux invertébrés (Rowley & Powell, 2007), dont les mécanismes innés de défense sont finalement loin d'être simples, d'être bien compris et, sans doute, d'être homogènes entre les organismes

(Loker, Adema *et al.*, 2004). C'est notamment le cas chez des groupes majeurs d'invertébrés comme les Echinodermes, les Arthropodes et les Mollusques qui combinent plusieurs mécanismes de modification du codage germinal de l'immunité (FREPs, épissage alternatif des introns et recombinaisons génomiques) aboutissant à un polymorphisme d'expression des molécules de défense.

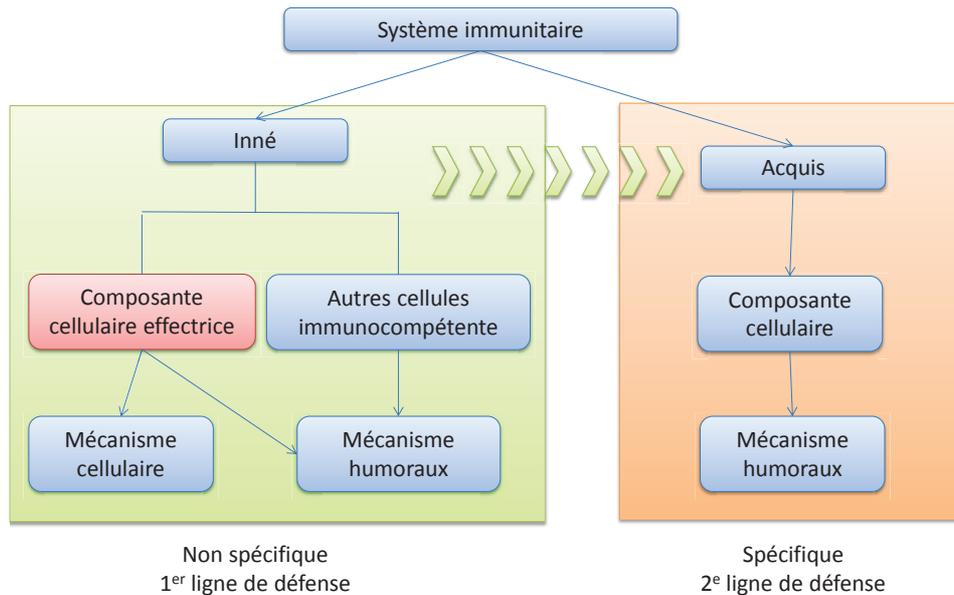
		LRR	TLR	Lectine	C/TEP	ProPO	Igsf	AMP	NK, NK-L	Igsf	RAG	TCR	Epissage alternatif	Som ADN			
Invertébrés	Bilatériens	<u>Gnathostomes</u> <i>du requin au mammifères</i>		X	X	X	X	X	X		V-C1	X	X	X	X		
		<u>Agnathe</u> <i>Lamproie</i> <i>Myxines</i>		X	X		X		V-C			VLR				X	
		Deutérostomiens															
		Céphalochordés <i>Amphioxus</i>				X		X	V			VCBP					
		Urochordés <i>Ascidies</i>		X		X	X	X	V-I C2-C1		X						
		<u>Echinodermes</u> <i>Oursins</i>		X	X	X	X	X							X		
		Plathelminthes <i>Vers plats</i>															
		Annélides <i>Vers ronds</i>				X		X			X						
		Protostomiens															
		<u>Mollusques</u>			X	X	X	X	V-I C2	X		FREP			X	X	
		Némertes <i>Vers rubanés</i>															
		Siponcles									X						
		Nématodes <i>C. elegans</i>				X		X	V-I C2	X					X		
		<u>Arthropodes</u> <i>Insectes</i>		X	X	X	X	X	V-I C2	X					X		
		Cnidaires <i>Coraux</i>					X	X									
Porifères <i>Eponges</i>				X		X	V-I C2										
Plantes		X															

**Figure 2. Phylogénie simplifiée de l'immunité.**

Le rouge indique des molécules ou des mécanismes impliqués dans l'immunité innée. Le bleu indique des molécules dont les gènes se diversifient de façon somatique et sont impliqués (ou soupçonnés de l'être) dans l'immunité adaptative. L'orange indique les mécanismes somatiques au niveau de l'ADN ou d'ARN afin de générer ou de maximiser la diversité immunitaire. Les taxons soulignés indiquent que les représentants de ces groupes ont des mécanismes de diversification des gènes immunitaires. Som ADN : modification de l'ADN somatique. D'après (Flajnik & Du Pasquier, 2004).

# Chapitre 1. L'immunité exclusivement innée des invertébrés.

La diversification des formes de vie depuis plus de 3 milliards d'années a conduit au développement de dialogues variés entre les êtres vivants. Les attaques virulentes des pathogènes sont un type particulier d'interaction auxquelles les hôtes répondent par des défenses efficaces. Le maintien de l'intégrité immunitaire des individus est un moteur de l'évolution (Hoffmann, Kafatos *et al.*, 1999). Chez les métazoaires, ce système inclut deux formes d'immunité : l'**inné** présent chez toutes les espèces vivantes et l'**adaptatif** présent uniquement à partir des gnatostomes (Flajnik & Du Pasquier, 2004). Depuis la découverte des Toll Like Receptors (TLR) et plus généralement des Pattern Recognition Receptors (PRR), il est largement admis que, chez les vertébrés, la réponse innée précède et guide la réponse adaptative (Galli, Nakae *et al.*, 2005). En effet, les PRR exprimés par les cellules de l'immunité innée captent des signaux de danger correspondant à des motifs moléculaires propres aux pathogènes, en anglais *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs). Ces signaux déclenchent la phagocytose. Les microorganismes capturés par les phagocytes, sous l'action de la protéolyse à pH acide ou de l'immunoprotéasome, fournissent spécifiquement d'autres motifs moléculaires caractéristiques aux pathogènes, sortes de PAMPs secondaires appelés dans ce cas antigènes (Rivett & Hearn, 2004). Les antigènes sont présentés à la surface des cellules par les molécules du CMH dans le domaine restreint des synapses immunologiques – une fonction encore portée par les cellules de l'immunité innée. Cette signalisation juxtacrine, à laquelle s'ajoute la sécrétion paracrine de diverses cytokines, active l'immunité adaptative en recrutant les clones *ad hoc* du répertoire des lymphocytes B et T. En ce sens, l'innée « drive » l'acquis (Janeway, Murphy *et al.*, 2009). Les deux formes d'immunité (**Figure 3**) reposent à la fois sur des mécanismes cellulaires et humoraux (Male, 2006).



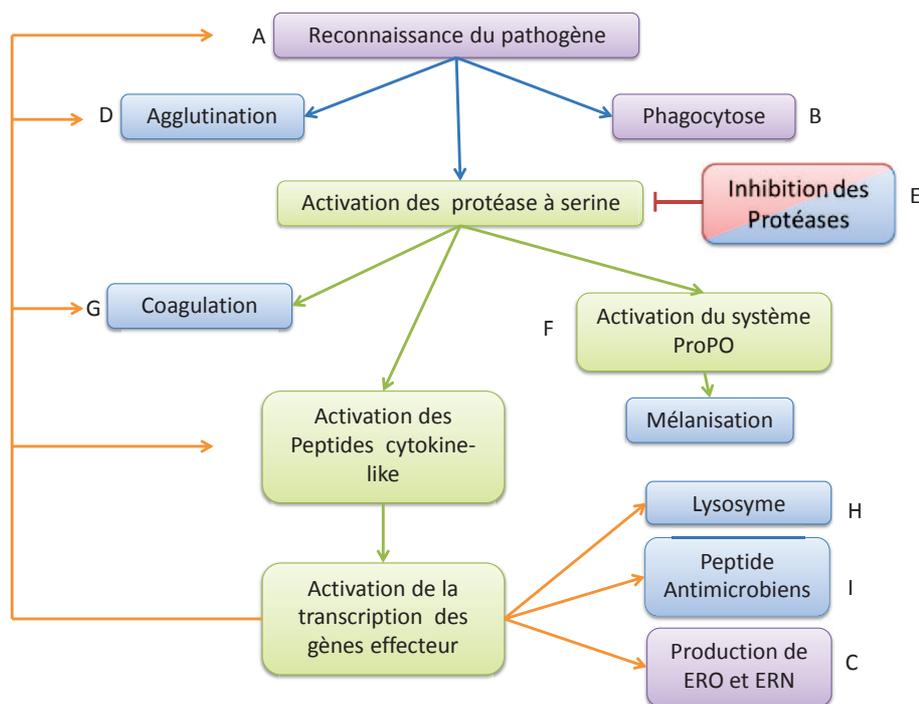
**Figure 3. Représentation schématique du système immunitaire : l'innée « drive » l'acquis chez les vertébrés**

*D'après (Janeway, Murphy et al., 2009)*

Dès lors, les fonctions de l'immunité innée sont principalement appréhendées ainsi, comme une machinerie initiale, comme un processus préparatoire à l'immunité adaptative. Est-ce vraiment le cas ? Chez les vertébrés, en fin de compte qu'elle est la part de chacun des deux systèmes ? L'immunité innée n'est-elle pas la réponse prééminente dans la lutte contre les pathogènes ?

Les processus de lutte contre les pathogènes décrits chez les invertébrés peuvent fournir des réponses à ces questions. En effet, ces organismes sont très majoritairement représentés dans le règne animal en termes d'abondance individuelle, de biomasse et de diversité des taxons avec plus de 1,2 millions d'espèces connues soit 90% des espèces animales, d'ancienneté à l'échelle de l'évolution et de colonisation des différents milieux de vie (Museum, 2012). Subissant de fortes variations de température, ces animaux poïkilothermes dotés d'une immunité exclusivement innée que l'on pourrait considérer comme partielle ou dépouillée d'importantes fonctions, indéniablement moins complexe que celle des vertébrés, parfois qualifiée de « vestige de l'évolution » (Paris, 2012), n'en développent pas moins une défense robuste contre de nombreuses espèces de pathogènes et tolérante contre certains symbiotes (Kvell, Cooper *et al.*, 2007), en homéostasie réduite, c'est-à-dire en condition de fluctuation de nombreux facteurs abiotiques comme le pH, l'osmolarité, la pression hydrostatique (Bettencourt, Dando *et al.*, 2008) ou encore la contamination chimique chronique ou accidentelle (Galloway & Depledge, 2001).

Phylogénétiquement, les invertébrés représentent donc le triomphe de l'immunité innée (Vuitton, 2009). Les mécanismes fins de cette immunité particulièrement efficace restent cependant encore peu connus car relativement peu étudiés (Kurtz, 2004). Basiquement, elle développe une composante basale et une composante inductible (Hamilton, Siva-Jothy *et al.*, 2008), toutes deux reposant sur des mécanismes comprenant une immunité cellulaire caractérisée par la réaction phagocytaire et une immunité humorale reposant sur la libération de peptides antimicrobiens et de récepteurs solubles à l'invasisseur (Dzik, 2010). La **Figure 4** présente de manière synthétique les composantes de l'immunité innée des invertébrés. Les lettres situées associées aux différentes boîtes correspondent aux chapitres traités ci-après. Ces différents points seront repris ensuite en miroir afin de proposer un état des connaissances spécifique chez les bivalves et dans le genre *Mytilus* si possible.



**Figure 4. Les mécanismes innés de défense.**

*En violet la composante cellulaire, en bleu la composante humorale. Les flèches orange indiquent une expression des facteurs, les flèches bleues une activation direct et les vertes une activation liée à une cascade enzymatique. D'après (Barillas-Mury, Wizel *et al.*, 2000)*

# ***I. Les mécanismes de l'immunité innée à médiation cellulaire***

Le système immunitaire inné des invertébrés est divisé en défenses humorales qui incluent la production de molécules effectrices solubles et les défenses cellulaires comme par exemple la phagocytose et encapsulation qui sont médiées par des hémocytes. Ces actions cellulaires exigent que les hémocytes reconnaissent d'abord une cible identifiée comme étrangère, il s'en suit l'activation de la signalisation en aval puis les réponses effectrices. (Lavine & Strand, 2002). Le rôle central des hémocytes chez les invertébrés est à l'origine de l'expression « The hemocyte does everything » (Nappi & Christensen, 2005)

## **A. Reconnaissance des pathogènes : PAMPs et PRRs**

La compréhension relativement récente de la nature de la reconnaissance des pathogènes et des mécanismes de signalisation dans la défense immunitaire innée a considérablement changé les idées précédentes sur ce système. Janeway a été parmi le premier à proposer l'existence d'une classe de récepteurs immunitaires innés, les PRRs, reconnaissant des structures microbiennes conservées ou «modèles», les PAMPs, avant même leur identification moléculaire (Janeway, 1989). Le répertoire des PRRs est très vaste, et de même, les classes d'agents pathogènes reconnus par les PRRs sont très diverses. En outre, une propriété importante de ce système est qu'aucun agent pathogène n'est détecté par un seul type de PRR (Lata & Raghava, 2008). Au contraire, des PRRs différents sont activés par des PAMPs différents d'un même agent pathogène.

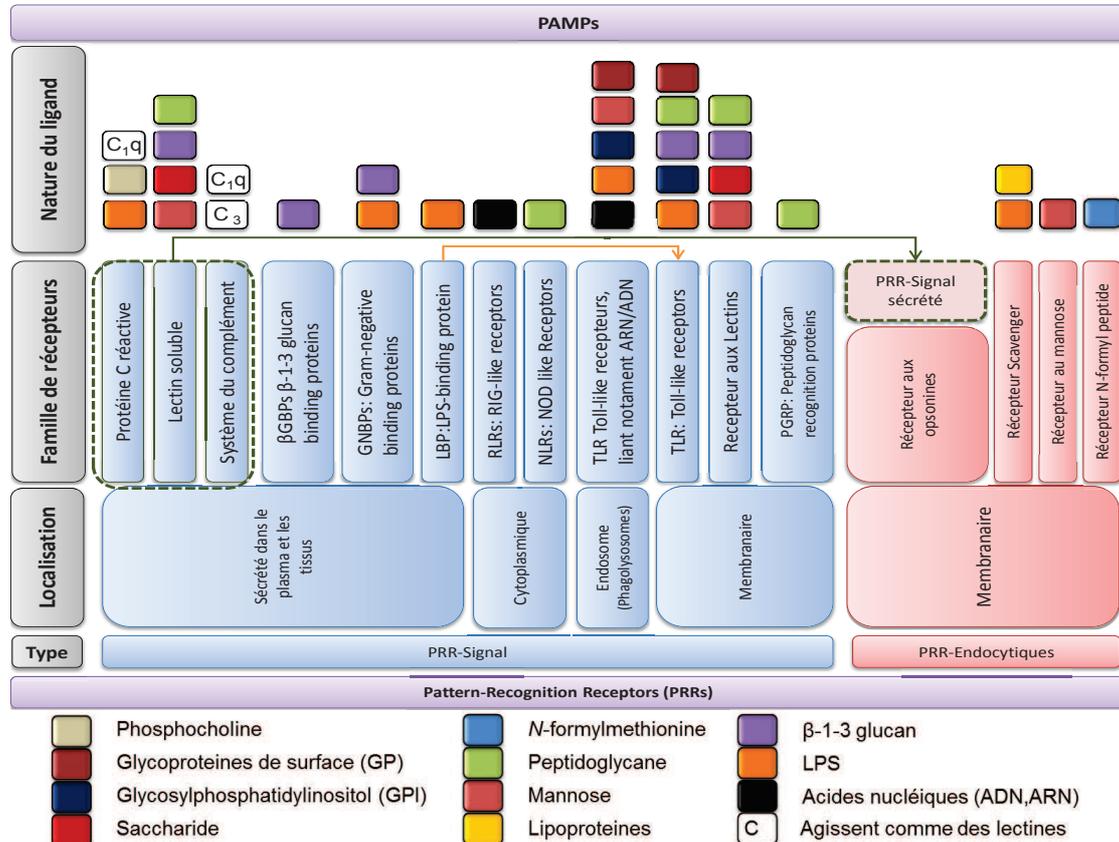
Dans certains cas, les PRRs peuvent aussi reconnaître certains facteurs de l'hôte comme des signaux de « danger ». Plusieurs protéines sécrétées par l'hôte, les motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs), sont libérées lors de lésions tissulaires et activent les récepteurs de reconnaissance innée (Cunha, Carvalho *et al.*, 2012) (Matzinger, 2002). Lors de la reconnaissance

***PAMPs***: *pathogen-associated molecular pattern. Structures moléculaires glucidiques, protéiques, lipidiques ou combinées produites uniquement par les micro-organismes. Elles sont hautement conservées et dans la plupart des cas essentielles à la survie du micro-organisme.*

***Inflammation***: *terme générale pour l'accumulation locale de liquide, de protéines plasmatiques, et de cellules immunitaires initiée par une blessure, une infection ou une réponse immunitaire locale. (Janeway, Murphy et al., 2009)*

d'un PAMP, les PRRs membranaires ou intracellulaires signalent à l'hôte la présence du pathogène et déclenche des réponses pro-inflammatoires et antimicrobiennes en activant une multitude de voies de signalisation intracellulaires, comprenant des molécules adaptatrices, des kinases, et des facteurs de transcription (Tsakas & Marmaras, 2010). La transduction du signal induit par la voie des PRRs aboutit à l'activation de l'expression génique d'une large gamme de molécules : cytokines, chimiokines, molécules d'adhésion cellulaire et immunorécepteurs, qui, ensemble, orchestrent la réponse de l'hôte vis-à-vis de l'infection (Tsakas & Marmaras, 2010).

Les PRRs peuvent être classés en 2 groupes, les PRR-endocytiques, favorisant l'endocytose, et les PRR-sigaux qui transduisent le signal et aboutissent à l'expression génique des acteurs moléculaires de l'inflammation. Sans être exhaustif, le **Tableau 1**, reprend ces 2 groupes et liste un certain nombre de ces récepteurs pour illustrer l'hétérogénéité spatiale et fonctionnelle ainsi que l'éclatisme de la nature moléculaire des PAMPs reconnues. Toutes les classes de molécules : lipide, glucide, protéine, acide nucléique (Lata & Raghava, 2008) provenant des virus, bactéries, levures, parasites, peuvent être reconnues et déclencher une réponse adéquate (Akira & Takeda, 2004; Tsakas & Marmaras, 2010; Cunha, Carvalho *et al.*, 2012).



**Tableau 1. Liste non exhaustive de quelques PRRs avec les PAMPs associés**

Chez les invertébrés, la reconnaissance du pathogène est un processus de type « one shot », au coup par coup, qui n'entraîne pas la trilogie amorçage/mémorisation clonal/réponse secondaire adaptée et n'implique pas de présentation dans un environnement restreint à un complexe moléculaire d'histocompatibilité, au sens strict. Cependant, des études ont identifié des phénomènes d'allorecognition, chez les invertébrés, impliqués notamment dans la survie des colonies chez certains urochordés (Raftos, Briscoe *et al.*, 1988; Saito, Hirose *et al.*, 1994; Cadavid, 2004; Khalturin, Kurn *et al.*, 2005; Nyholm, Passegue *et al.*, 2006). Par conséquent, l'allorecognition pourrait être un processus antérieur à

l'apparition de l'immunité adaptative (Costa, Dios *et al.*, 2009). Bien que durant ces dernières années le modèle drosophile ait permis d'apprendre beaucoup sur la réponse immunitaire invertébrée (Hoffmann, Kafatos *et al.*, 1999; Medzhitov, 2001), les molécules et les processus liés à l'allorecognition chez ces organismes, restent mal compris (Costa, Dios *et al.*, 2009). Récemment, plusieurs gènes très variables pouvant être liés à allorecognition ont été identifiés (pour revue (Khalturin & Bosch, 2007)). C'est le cas des protéines analogues au fibrinogène (FREPs) de l'escargot d'eau douce *Biomphalaria glabrata*, qui contiennent des domaines d'immunoglobuline (Zhang, Adema *et al.*, 2004). Chez les ascidies, le gène hautement polymorphe FuHc de *Botryllus schlosseri* (Nyholm, Passegue *et al.*, 2006), les récepteurs auto-stérilité de *Halocynthia* (Sawada, Tanaka *et al.*, 2004) ou le gène vCRL1 de *Ciona intestinalis* (Kurn, Sommer *et al.*, 2007) pourraient jouer ce rôle.

D'autres correspondances peuvent être établis entre immunité inné et adaptative au niveau de la reconnaissance des pathogènes. A l'instar des immunoglobulines qui acquièrent une résolution inégalée des paratopes, grâce à un assemblage par épissage alternatif des segments V-(D)-J et hypermutation somatique, la molécule d'adhésion cellulaire (Dscam, Down syndrome cell adhesion molecule), qui semble jouer ce rôle dans l'immunité des invertébrés, peut prendre quelques dizaines de milliers de formes différentes à travers l'épissage alternatif (Dong, Taylor *et al.*, 2006; Smith, Mwangi *et al.*, 2011). Une étude récente a rapporté des niveaux élevés de Dscam dans l'hémolymphe de drosophile. L'utilisation d'ARNi (ARN interférant) pour dépléter la protéine Dscam révèle une atteinte de

---

**Histocompatibilité:** Littéralement : compatibilité tissulaire. Elle désigne le taux de compatibilité entre deux tissus, qui permet à une greffe de ne pas être rejetée. Cette compatibilité repose sur les molécules du CMH –dépendant des patrimoines génétiques du donneur et du receveur. Ces complexes participent aux réponses immunitaires, c'est la clef de l'immunité cellulaire et de la communication entre l'inné et l'acquis.

**Allorecognition :** capacité d'un organisme à distinguer ses propres cellules parmi celles d'un autre individu faisant partie de la même espèce.

---

la capacité des hémocytes à phagocyter des bactéries (Watson, Puttmann-Holgado *et al.*, 2005). De même, l'extinction de Dscam de l'*Anopheles gambiae* (AgDscam) compromet la capacité du moustique de résister à *Plasmodium*. En outre, il a été montré que le répertoire des protéines Dscam exprimées varie par épissage alternatif du gène AgDscam en fonction des espèces de pathogènes *Plasmodium berghei* ou *Plasmodium falciparum* infectant l'anophèle (Dong, Taylor *et al.*, 2006).

## B. Phagocytose

La phagocytose est le processus par lequel les cellules de défense, circulantes ou résidentes, ingèrent activement une ou plusieurs particules, souvent d'origine étrangère, généralement des pathogènes (Janeway, Murphy *et al.*, 2009). Il s'agit d'un phénomène observé dans tout le règne animal (Jiravanichpaisal, Lee *et al.*, 2006). Pour certains invertébrés, en particulier les filtreurs, la phagocytose est également impliquée dans le transport des nutriments (Smith, 2001). Il s'agit d'un processus en plusieurs étapes incluant : la reconnaissance de l'élément à phagocyter par des récepteurs de surface cellulaire, l'internalisation puis la fusion avec des compartiments endomembranaires lytiques : les phagosomes, pour la destruction de la particule ingérée (Smith, 2001).

Par l'ingestion de pathogènes microbiens, les cellules phagocytaires accomplissent deux fonctions essentielles des systèmes immunitaires. Tout d'abord, elles initient une voie de destruction microbienne. Secondairement, chez les organismes possédant un système immunitaire adaptatif, les cellules phagocytaires et en particulier les cellules dendritiques, utilisent la phagocytose pour produire les antigènes qui seront présentés à la surface par les CMH I et II. Ainsi, la phagocytose joue un rôle double pour ces organismes : effecteur de l'immunité innée, et pont entre les réponses immunitaires innées et adaptatives (Janeway, Murphy *et al.*, 2009). Chez les invertébrés, seul le premier rôle est considéré.

La phagocytose s'exécute en plusieurs étapes. Elle nécessite au préalable une activation des cellules compétentes via les PAMPs et des cytokines amplifiant la réponse comme le TNF et IL1 (Newton & Dixit, 2012). Les phagocytes circulants expriment des récepteurs glycoprotéiques de surface comme, CD44, PSGL1 (*P-selectin glycoprotein ligand 1*), ESL1 (*E-selectin ligand*) et des intégrines qui augmentent leur capacité d'adhésion avant d'être attirés par le site de l'infection. Cette migration cellulaire est orientée par la présence de molécules attractives tels que certains facteurs bactériens (protéines bactériennes, LPS,

peptidoglycane...), des chimiokines (cytokines chimiotactiques), produits de dégradation de la fibrine, ou les phospholipides libérés par des cellules hôtes blessées selon un mécanisme globalement appelé chimiotactisme (Richardson, Pepper *et al.*, 1976 ; Luster, 2001 ; Newton & Dixit, 2012), qui sera traité

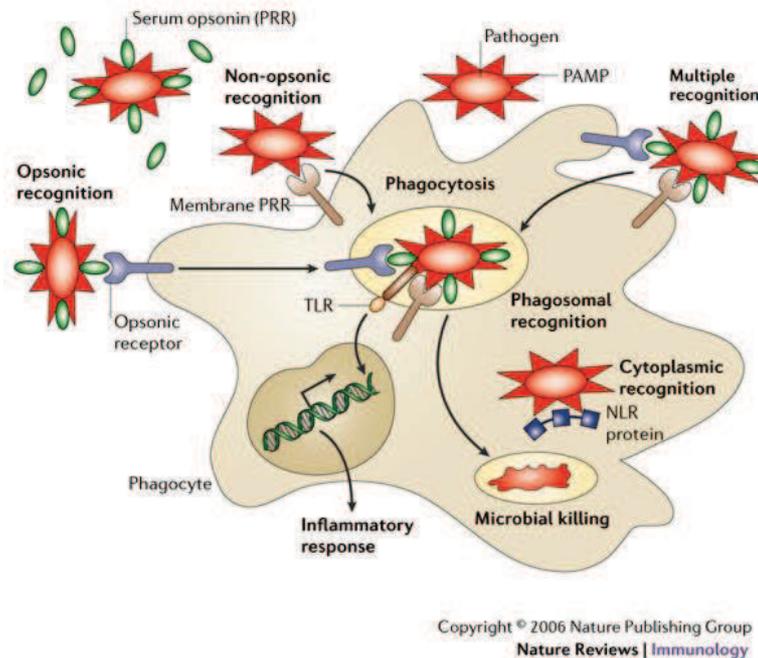
Chapitre 2.I.

**Cytokines** : substances solubles de communication synthétisées par les cellules du système immunitaire ou par d'autres cellules et/ou tissus, agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. (Revillard, 2001; Malagoli, 2010)

Après cette phase migratoire menant au site d'infection, les phagocytes se lient à l'élément à phagocyter. Deux cas de figures sont observés : la liaison non améliorée et la liaison améliorée (Stuart & Ezekowitz, 2005). La fixation non-améliorée est la reconnaissance des pathogènes, présentant leurs PAMPs, par les PRR induisant l'endocytose (**Tableau 1**). La liaison améliorée fait intervenir quant à elle un ou plusieurs acteurs moléculaires supplémentaires : les opsonines (**Tableau 1**). Ce processus, également connu sous le terme d'opsonisation (**Figure 5**), permet l'amélioration de l'attachement qui devient alors plus précis et plus efficace (Lee, Harrison *et al.*, 2003; Stuart & Ezekowitz, 2005).

Après liaison, un remaniement complexe de la membrane impliquant entre autre la polymérisation puis dépolymérisation des filaments d'actine permet l'émission de pseudopodes englobant la particule avant de l'internaliser dans une vésicule d'endocytose appelé phagosome qui fusionnera avec le lysosome (Yutin, Wolf *et al.*, 2009). Le phagolysosome, résultat de cette fusion, est caractérisé par un pH acide (pH inférieur à 5,5) et une richesse en enzymes hydrolytiques fonctionnant à pH acide (Blanchette, Woo *et al.*, 2009). Ce faible pH inhibe la croissance microbienne et améliore l'activité des enzymes de dégradation contenue dans le lysosome. Fait intéressant, la baisse de pH dans les phagosomes a été identifiée il y a 70 ans chez l'amibe (Mast, 1942). C'est seulement récemment qu'il a été démontré que cette chute de pH ne dépend pas de la fusion phagosome-lysosome, mais est médié par une ATPase vacuolaire (ou V-ATPase) active à la membrane du phagosome (Blanchette, Woo *et al.*, 2009). C'est seulement au début de l'acidification, que le lysosome fusionne avec le phagosome (McNeil, Tanasugarn *et al.*, 1983). Il existe deux principaux mécanismes cytotoxiques de destruction des pathogènes dans les cellules phagocytaires. Le système oxydant s'appuie sur la production d'espèces radicalaires réactives oxygénées (ROS pour *Reactive Oxygen Species*) et/ou azotées (RNS pour *Reactive Nitrogen Species*). Le système indépendant de l'oxygène, en fait non radicalaire, fait intervenir des activités enzymatiques spécifiques (Smith, 2001). Les principales enzymes lysosomales chez les invertébrés sont la phosphatase acide ou alcaline,  $\beta$ -glucuronidase, le lysozyme, les estérases

et les protéases. Les enzymes sont directement déchargés à partir du lysosome qui fusionne dans le phagosome (Smith, 2001).



**Figure 5. Différents modes de reconnaissances d'un pathogène menant à la phagocytose.** Les micro-organismes, tels que les champignons, peuvent être reconnus directement par les PRRs membranaires (reconnaissance non opsonique ; **Tableau 1**), ou indirectement (reconnaissance opsonique) : les PRRs sérique (**Tableau 1**) se lient aux pathogènes permettant alors la reconnaissance par les récepteurs aux opsonines (**Tableau 1**). Dans la plupart des cas, la reconnaissance est complexe, elle implique à la fois de multiples récepteurs opsoniques et non opsoniques conduisant à l'absorption du micro-organisme et à sa destruction. La reconnaissance microbienne se produit également de façon intracellulaire, dans les vacuoles ou dans le cytoplasme (**Tableau 1**). Cette reconnaissance induit une production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines, ainsi que l'expression génique de TLR-spécifiques au pathogène reconnu. D'après (Brown, 2006)

Chez les invertébrés, le type et le nombre de phagocytes varient entre les espèces, de même que l'efficacité de l'absorption de particules (Smith, 2001). Par exemple, les bivalves montrent des niveaux remarquablement élevés de la phagocytose, avec 70% ou plus des hémocytes circulants actifs dans cette réponse et capables d'ingérer au moins 10 particules en 1 heure telles que le cytoplasme devient distendu (Wootton, Dyrinda *et al.*, 2003b). À l'autre extrémité de l'échelle, les taux de cellule phagocytant chez le crabe et l'écrevisse sont d'environ 2-15% (Söderhäll, Smith *et al.*, 1986), (déterminée *in vitro*), avec moins de particules absorbées par cellule (Smith, 2001). Plusieurs facteurs peuvent influencer les valeurs rapportées dans l'absorption *in vitro* de particules par les phagocytes d'invertébrés, en particulier le type de particules (bactérie ou bille de latex), les conditions de culture (temps

d'incubation, température) et de la présence ou non d'opsonines améliorant la phagocytose (Smith, 2001; Wootton, Dyrynda *et al.*, 2003b).

Il est à noter que l'activité phagocytaire, chez la *Drosophile*, est régulée par une protéine intervenant dans la régulation circadienne : Timeless (Tim). Cette protéine induit un pic d'activité phagocytaire la nuit, uniquement lors de challenges avec des bactéries spécifiques. De plus Tim régule à la hausse la phagocytose de *Staphylococcus aureus*, mais pas de *Escherichia coli*, ceci suggère que Tim intervient lors de la première étape de la phagocytose : la reconnaissance du pathogène par les PRRs (Stone, Fulton *et al.*, 2012).

### C. Action cytotoxique par production de ROS et RNS

Les ROS sont une famille d'espèces chimiques oxygénées extrêmement réactives regroupant les radicaux libres possédant un électron célibataire non apparié et également des dérivés non radicalaires dont la toxicité est importante (Freitas, Lima *et al.*, 2009). De la même façon, les dérivés réactifs de l'azote sont capables de réagir avec de nombreux composants intracellulaires. Le **Tableau 2** liste quelques uns des ERO et ERN les plus souvent rencontrés dans la littérature.

	Quelques EROs et ERNs	Symbole
dérivés non radicalaires	anion peroxyde	$O_2^-$
	peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
	peroxynitrite	$ONOO^-$
	anion hypochlorite	$ClO^-$
radicaux libres	anion superoxyde	$O_2^{\circ}$
	radical hydroxyle	$HO^{\circ}$
	radical hydroperoxyde	$HO_2^{\circ}$
	radical alkoxy	$RO^{\circ}$
	radical peroxyde	$ROO^{\circ}$
	dioxygène singulet	$^1O_2$
	monoxyde d'azote	$NO^{\circ}$

**Tableau 2. Récapitulatif des ROS et RNS les plus couramment rencontrés**

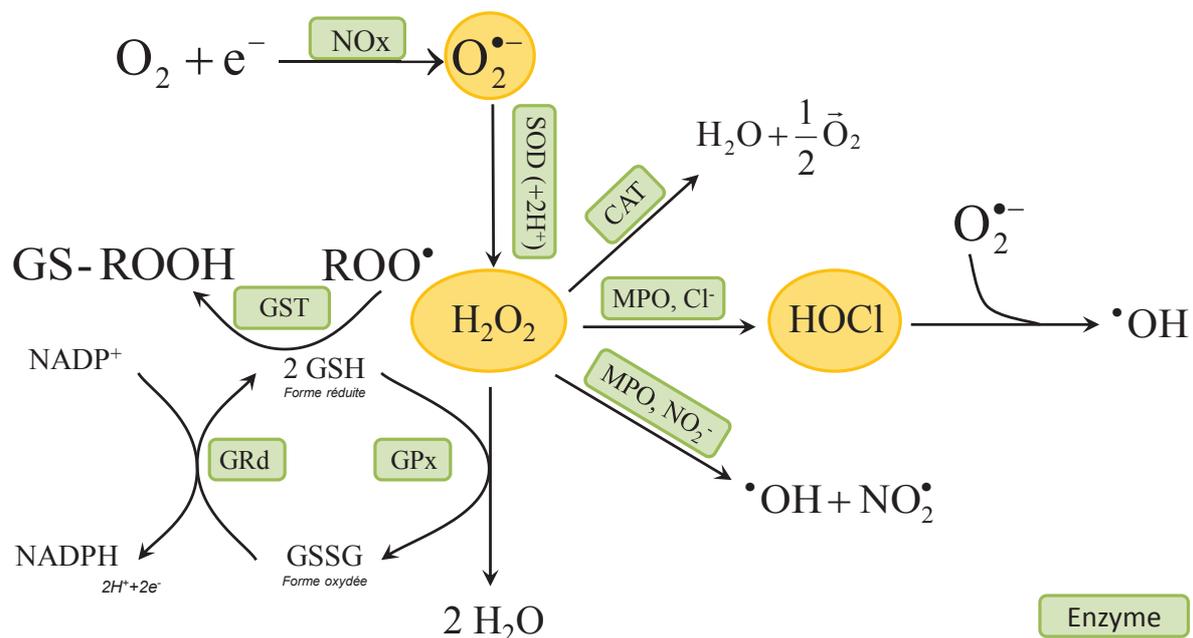
*Les espèces réactives de l'oxygène sont indiquées en bleu et ceux de l'azote en vert. ° signifie la présence d'un électron célibataire, ce sont des radicaux libres extrêmes réactifs.*

D'un point de vue cellulaire, les ROS et RNS peuvent être de source exogène, mais dans leur majorité elles sont le produit du métabolisme. La fraction exogène provient des phénomènes physiques ionisants directs (radiations X ou gamma, UV) ou indirects via la radiolyse de l'eau, ou d'autres réactions photochimiques. Les sources endogènes impliquent toutes des réactions enzymatiques, cependant les espèces réactives générées peuvent être considérées comme des métabolites secondaires ou au contraire comme le produit principal des réactions. La fraction endogène secondaire résulte de la respiration cellulaire. Dans les organismes multicellulaires, l'oxygène est réduit à 90 % dans les mitochondries par voie enzymatique en une molécule non toxique : l'eau H<sub>2</sub>O. Cependant, une fraction de l'ordre de 0,2 à 2 % subit une réduction monoélectronique et forme une espèce radicalaire : l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Balaban, Nemoto *et al.*, 2005). Cet anion n'est pas le radical le plus délétère, cependant il peut donner naissance à des espèces beaucoup plus réactives comme le radical hydroxyle HO<sup>•</sup>.

Les ROS de source endogène sont aussi le principal produit des réactions cytotoxiques mises en œuvre par les phagocytes pour détruire les pathogènes ingérés. Ces réactions sont à l'origine d'une brutale augmentation de la consommation cellulaire d'oxygène moléculaire, phénomène appelé « flambée oxydative » (ou « burst oxydatif ») et décrit extensivement dans les cellules de l'immunité innée de type macrophages/neutrophiles (Dahlgren & Karlsson, 1999). La flambée oxydative est due à l'activation d'une activité NADPH oxydase dormante. Cette activité est portée par un complexe multienzymatique qui devient la principale source d'anions O<sub>2</sub><sup>•-</sup> lorsque ses quatre sous-unités cytosoliques rejoignent un cytochrome *b* qui reste lié à la membrane. Les voies de signalisation aboutissant à l'assemblage de la NADPH oxydase sont nombreuses. On peut citer la voie des phosphoinositides-3-kinases activées par le récepteur du fMLP (N-formyl-méthionine-leucine-phenylalanine), un tripeptide chimiotactique libéré par certaines bactéries (Rommel, Camps *et al.*, 2007) ou encore la mobilisation du calcium intracellulaire et la protéine kinase C (Jiang, Zhang *et al.*, 2011). 95 % de l'activité NADPH oxydase est localisée au niveau de la membrane de granules intracellulaires et 5 % au niveau de la membrane plasmique des neutrophiles (Dahlgren & Karlsson, 1999). L'anion O<sub>2</sub><sup>•-</sup> est peu réactif vis-à-vis de la plupart des substrats biologiques mais il est rapidement transformé en peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par réaction spontanée au pH acide des phagolysosomes mais aussi grâce à l'activité superoxyde dismutase (SOD) des microorganismes phagocytés. Il est intéressant de noter que la molécule H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut diffuser aisément d'une cellule à l'autre. Finalement, la plus grande partie du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit par les phagocytes est transformée par une autre enzyme, la myéloperoxydase (MPO). La MPO est

stockée dans les granules azurophiles, de couleur rouge pourpre, et libérée dans les phagosomes pendant la phagocytose (Freitas, Lima *et al.*, 2009). La MPO constitue 5 % du total en protéines des neutrophiles. A partir du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cette enzyme produit de l'acide hypochloreux (HOCl) qui constitue l'oxydant bactéricide le plus puissant connu, 1000 à 10 000 fois plus toxique que O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hampton, Kettle *et al.*, 1998).

La présence d'espèces activées de l'oxygène a des conséquences potentiellement graves pour la cellule. Les organismes vivants possèdent des systèmes de défense (**Figure 6**) ; ainsi à l'état physiologique il existe un équilibre "naturel" entre la production des radicaux libres et les systèmes enzymatiques antioxydants (SOD, Catalase, GST) ou scavenger (certaines vitamines, uncoupling proteins (UCPs)) (Buttemer, Abele *et al.*, 2010). Sous certaines conditions, il apparaît un déséquilibre, connu sous le terme de « stress oxydant » provoqué soit par une production exagérée de radicaux libres soit par une diminution des défenses antioxydantes sous l'effet de certaines conditions : pollutions environnementales comme par exemple l'exposition aux métaux (Mottin, Caplat *et al.*, 2012) ou encore la ré-oxygénation hypoxico-hyperoxico lors de la baignade des bivalves (Letendre, Chouquet *et al.*, 2009).



**Figure 6. Les trois principales activités enzymatiques du système d'attaque radicalaire des phagocytes.**

La production de l'acide nitreux fait successivement appel aux activités NADPH oxydase (NOx), superoxyde dismutase (SOD) et myéloperoxydase (MPO). Les systèmes antioxydants impliquent notamment la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion réductase (GRd) et la glutathion-S-transférase (GST).

Les ROS ont longtemps été considérées comme des agents cytotoxiques en raison des dommages oxydatifs qu'elles causent à la cellule. En 2012, Naviaux émet l'idée que le stress oxydant ne serait qu'un mécanisme de défense (altruisme) de l'organisme et parle de « oxidative shielding ». En tout état de cause, il est important de noter que les dérivés réactifs interviennent dans des processus physiologiques autres que l'élimination des pathogènes.

Leur rôle dans la signalisation est largement documenté chez de nombreuses espèces (Thannickal & Fanburg, 2000; Nappi & Christensen, 2005; D'Autreaux & Toledano, 2007). Par exemple les ERO interviennent dans la signalisation des mécanismes apoptotiques (Morey, Corominas *et al.*, 2003). L'oxyde nitrique est aussi principalement impliqué dans les processus de signalisation grâce à l'activation de la guanylate cyclase et la formation de GMPc (Guanosine MonoPhosphate cyclique). Dans les éponges, le NO est un signal cellulaire pour le stress environnemental (Giovine, Pozzolini *et al.*, 2001), pouvant ainsi représenter la plus primitive perception sensorielle dans le règne animal. Chez la drosophile, le NO induit l'expression d'un gène codant pour un peptide antimicrobien : la diptericin (Nappi, Vass *et al.*, 2000).

## ***II. Molécules et mécanismes de l'immunité innée humorale***

### **D. L'agglutination par les lectines et les FREPs**

Les lectines sont des protéines multivalentes impliquées dans la reconnaissance et l'agrégation des composés oligosaccharidiques et polysaccharidiques spécifiques, endogènes ou portées par des envahisseurs microbiens (Drickamer & Taylor, 1993). Découvertes il y a plus de 100 ans chez les plantes, les lectines sont toutefois connues pour leur caractère ubiquiste, en particulier à la surface des microorganismes, y compris les virus. Dans ce cas, elles sont parfois désignées sous le nom d'hémagglutinines ou adhésines (Sharon & Lis, 1989). Sur la base des similitudes entre les domaines de reconnaissance des glucides (CRD), les lectines animales sont classées en au moins 12 catégories, (Kilpatrick, 2002). L'interaction entre les lectines et les hydrates de carbone a été montrée pour être impliquée dans diverses activités et, par conséquent, différents rôles biologiques ont été proposés pour ces molécules. Les lectines participent au transport des glucides, des glycoprotéines et du calcium, interviennent dans le développement des insectes, peuvent avoir une activité cytotolytique et cytotoxique, médier l'adhésion cellulaire, la migration et l'apoptose, ou encore l'activation de

cascades protéolytiques du sang comme le système ProPO et la coagulation (Marques & Barracco, 2000; Kilpatrick, 2002).

Les recherches insistent cependant sur le rôle possible des lectines dans la reconnaissance des molécules étrangères à l'hôte et leur attribuent un rôle immunitaire chez les vertébrés comme chez les invertébrés (Vasta, Ahmed *et al.*, 1994; Arason, 1996; Kawabata & Iwanaga, 1999). Dans ce contexte immunitaire, les lectines agglutinent les micro-organismes ce qui améliore leur phagocytose, médiée par les récepteurs opsoniques présents à la surface d'hémocytes. De nombreux travaux indiquent que les lectines sont synthétisées par les cellules immunitaires d'invertébrés (Renwranz, Daniels *et al.*, 1985; Suzuki & Mori, 1990; Glinski, 1997 #42; Fisher & DiNuzzo, 1991; Richards & Renwranz, 1991; Arason, 1996; Dodd & Drickamer, 2001; Canesi, Gallo *et al.*, 2002; Bettencourt, Dando *et al.*, 2009).

Les protéines apparentées au fibrinogène (FREPs) constituent une famille de glycoprotéines qui contiennent dans la partie C-terminale d'un domaine fibrinogène-like (FBG), mais qui diffèrent dans la région N-terminale (Romero, Dios *et al.*, 2011). Cette famille comprend diverses protéines telles que la tenascine, la tachylectine, les ficolines, les angiopoïétines, ou encore les ixoderines.

La présence de FREPs est universellement observée, des vertébrés (Doolittle, 1992; Matsushita, Endo *et al.*, 1996) aux invertébrés comme les mollusques (Adema, Hertel *et al.*, 1997) et les arthropodes (Gokudan, Muta *et al.*, 1999; Rego, Hajdušek *et al.*, 2005), ce qui a permis de suggérer que le domaine FBG doit être antérieur à la divergence des protostomiens et deutérostomiens (Gorbushin, Panchin *et al.*, 2010).

Les FREPs jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée des invertébrés. Elles sont sécrétées à la suite d'une immunostimulation relativement spécifique (Adema, Hertel *et al.*, 1999) et se lient aux agents pathogènes ce qui détermine leur précipitation (Adema, Hertel *et al.*, 1997; Zhang, Zeng *et al.*, 2008). Par exemple, en présence de trématodes, les hémocytes de l'escargot *Biomphalaria glabrata* produisent une grande quantité de FREPs agissant comme des lectines et précipitant des PAMPs solubles dérivés des parasites (Adema, Hertel *et al.*, 1997). Les FREPs sont aussi souvent impliquées comme médiateurs de la reconnaissance des pathogènes chez les gastéropodes (Richards & Renwranz, 1991; Zhang & Loker, 2003; Hertel, Adema *et al.*, 2005).

En tant que protéines du système immunitaire ayant la capacité de reconnaître et de se fixer spécifiquement sur certains pathogènes, les lectines et les FREPs ont un rôle proche des

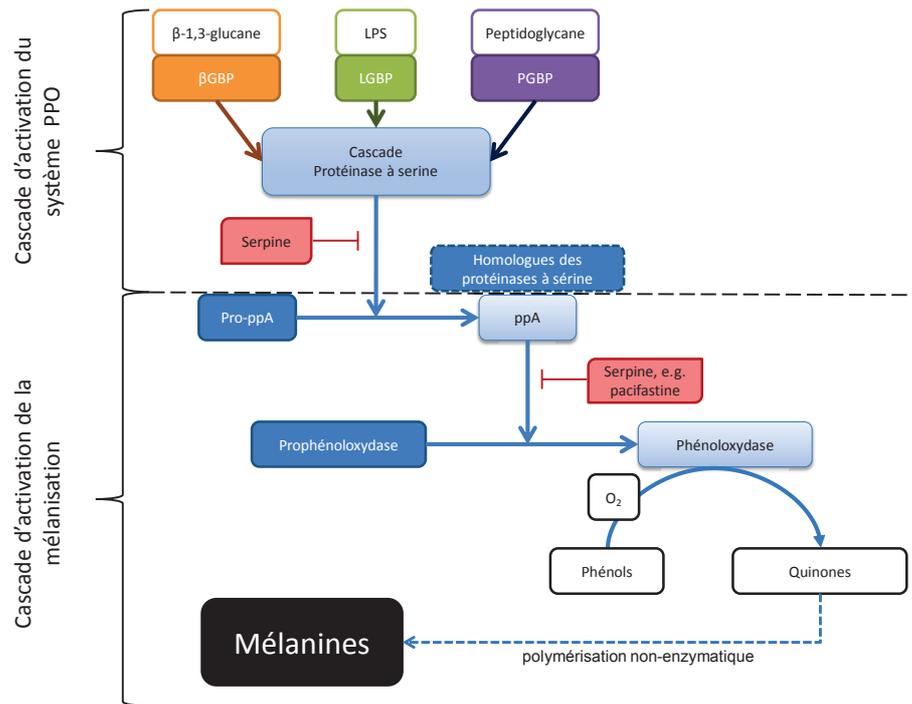
anticorps produits par les systèmes adaptatifs des vertébrés. Contrairement aux immunoglobulines, la spécificité des agglutinines d'invertébrés est limitée aux résidus glucidiques. Cependant, bien que les lectines ne soient pas exprimées dans le cadre d'une diversité recombinatoire, chacune possède plusieurs sites spécifiques de motifs glucidiques distincts d'un même ligand et montrent, en outre, une certaine flexibilité de liaison permettant la reconnaissance d'une gamme de glucides structurellement liée (Vasta, Ahmed *et al.*, 1994). Chez *Biomphalaria*, les FREPs montrent une diversité relativement élevée (Zhang & Loker, 2003; Zhang, Adema *et al.*, 2004).

## **E. Les inhibiteurs de protéases**

Les enzymes protéolytiques jouent de nombreux rôles physiologiques et sont des facteurs essentiels pour le contrôle homéostatique chez les eucaryotes ainsi que chez les procaryotes (Lopez-Otin & Bond, 2008). Les protéases microbiennes s'intègrent également d'un point de vue physiologique dans cycle de vie de ces organismes, mais ces enzymes produites par les micro-organismes pathogènes, et notamment par les agents pathogènes opportunistes, agissent parfois comme des facteurs toxiques pour l'hôte (Armstrong, 2006). Ces facteurs de virulence peuvent contribuer à induire une maladie chez l'hôte en agissant comme toxines ou agents hyper-stimulant les défenses immunitaires de l'hôte (McKerrow, Caffrey *et al.*, 2006). Les protéases sécrétées ou liées à la surface, trouvent un rôle dans l'invasion, l'évasion immunitaire, la nutrition et la reproduction du pathogène (Armstrong, 2006 ; Tanguy, 2013). Sans surprise, l'hôte produit des inhibiteurs qui sont capables d'inactiver et de détruire les protéases impliquées dans l'invasion. Par conséquent, en plus de réguler l'activité des protéases endogènes, ces inhibiteurs deviennent une composante importante de l'arsenal du système immunitaire pour lutter contre l'invasion. Les inhibiteurs de protéase sont répartis en deux classes : les inhibiteurs du site actif et les  $\alpha_2$ -macroglobulines (Armstrong, 2010). Les inhibiteurs de la première classe se lient et inactivent le site actif de la protéase cible. Les protéines de la seconde classe se lient aux protéases par un mécanisme de piège moléculaire unique et étiquettent ainsi la protéase liée au système d'endocytose médié par récepteur où elle pourra être dégradée dans les lysosomes (Sottrup-Jensen, 1989). Les protéines de la famille des  $\alpha_2$ -macroglobuline sont présentes dans une variété de phylums d'animaux, y compris les nématodes, arthropodes, mollusques, échinodermes, urochordés, et les vertébrés (Armstrong, 2010).

## F. Le Système ProPhénolOxydases et la mélanisation

Chez les invertébrés, le système des phénoloxydases (POs) est un système de défense humoral impliquant une cascade enzymatique d'activation, qui peut être activé par des signaux de danger associés aux pathogènes et dont le résultat ultime est le piégeage des matières étrangères dans une capsule de mélanine. Les POs sont présentes dans l'hémolymphe des invertébrés sous forme inactive : les prophénoloxydases (ProPOs). L'activation des ProPO, après plusieurs étapes de protéolyse par des protéases à sérine appelées « ProPO activating enzymes » (Pro-ppA), conduit à la mélanisation (Söderhäll & Cerenius, 1998). De nombreuses études ont montré que les PO étaient libérées, par les hémocytes de crustacés et d'insectes, dans la circulation générale (Söderhäll & Cerenius, 1998). Le système ProPO est activé par divers PAMPs tels que les  $\beta$ -1, 3-glucanes de parois cellulaires bactériennes, les lipopolysaccharides (LPS) de bactéries Gram-négatives, et ainsi que par des composants cellulaires fongiques (Luna-Gonzalez, Maeda-Martinez *et al.*, 2003). Ces PAMPs sont reconnues par les PRRs solubles comme la  $\beta$ GBP, la GGBP ou encore la LBP décrit dans le **Tableau 1**. A la suite de l'activation, le précurseur inactif est transformé en PO, qui catalyse à son tour l'oxydation des phénols en quinones, produits intermédiaires instables et hautement toxiques qui vont polymériser en mélanine de façon non-enzymatique (**Figure 7**). Du fait de sa dangerosité pour l'hôte, l'activation de la cascade ProPO est strictement contrôlée par des inhibiteurs de protéase (Söderhäll & Cerenius, 1998; Michel, Budd *et al.*, 2005; Liu, Jiravanichpaisal *et al.*, 2007). Il est intéressant de noter que chez les crustacés le système ProPO semble plus complexe car l'hémocyanine de l'hémolymphe possède aussi une activité phénoloxydase. L'hémocyanine est produite par l'hépatopancréas et reste localisée dans l'hémolymphe alors que la ProPO est exclusivement hémocytaire (Cerenius, Lee *et al.*, 2008).



**Figure 7. Le système Prophénoloxydase.**

*Le système est initialement activé par des PRRs capables de lier des PAMPs ou des DAMPs. Une cascade de sérines protéases, qui reste encore à caractériser et semble propres aux différentes espèces, provoque le clivage de la pro-forme de l'enzyme d'activation de la prophénoloxydase (Pro-ppA) en ppA active. Certaines ppA nécessitent la présence d'homologues des protéinases à sérine (Box en pointillé) alors que dans d'autres cas les ppA sont capables de cliver directement le ProPO en PO active. D'après (Cerenius & Soderhall, 2004)*

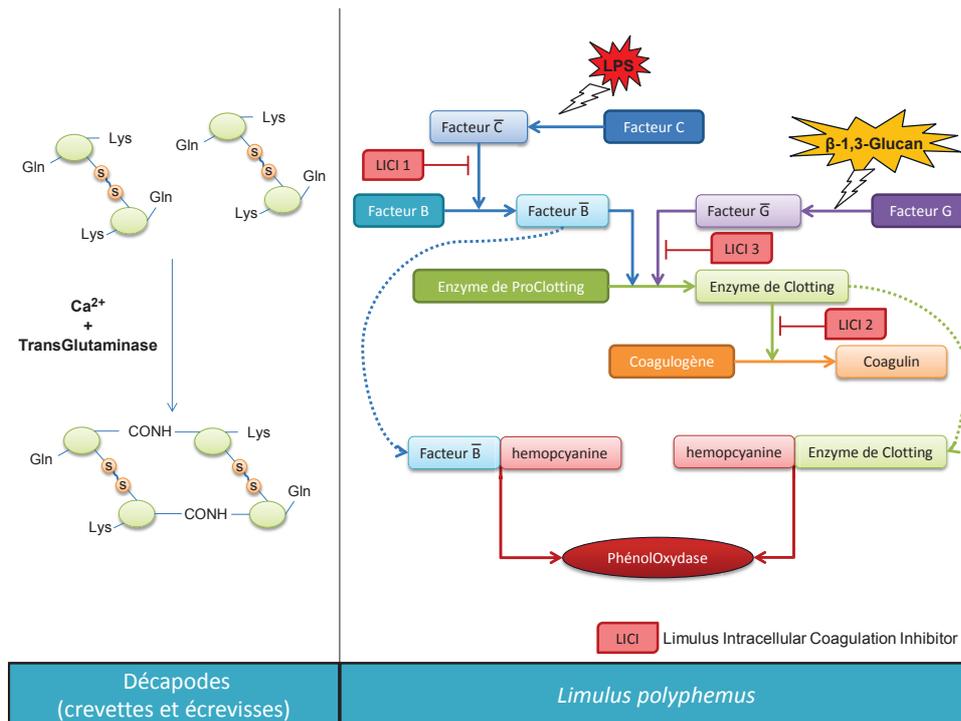
## G. La coagulation hémostatique

La coagulation, ou clotting, est un mécanisme très conservé au sein du règne animal. La réponse est immédiate et est provoquée là-aussi par une cascade enzymatique qui aboutit à la polymérisation de fibres, de matrices protéiques et de cellules sanguines piégées.

Chez tous les animaux, la coagulation a 2 fonctions majeures (Krarup, Wallis *et al.*, 2007). La première est de stopper l'hémorragie. En plus d'avoir des sévères conséquences sur le transport de l'oxygène, chez les invertébrés à corps mou comme par exemple les annélides, gastéropodes ou tous autres invertébrés ne possédant pas d'exosquelette, le fluide circulatoire fournit une pression hydrostatique nécessaire à leurs déplacements. Ainsi, une brèche doit être scellée rapidement. La seconde fonction de la coagulation est de participer à l'élimination de microorganismes qui auront profité de la lésion pour pénétrer l'organisme. Ce rôle est très important chez les invertébrés, dans lequel la coagulation emprisonne rapidement les micro-

organismes envahisseurs et empêche leur dispersion dans tout l'organisme. La plupart des recherches sur les mécanismes de la coagulation chez les invertébrés ont été réalisées chez les arthropodes et notamment chez la limule, *Limulus* (Theopold, Schmidt et al. 2004).

A ce jour trois mécanismes de coagulation sont décrits chez les Arthropodes. L'un des trois se retrouve dans les crustacés et les insectes (Muta & Iwanaga, 1996), où un gel est formé par polymérisation de protéines coagulables catalysées par une transglutaminase dépendante du calcium  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figure 8**). La transglutaminase est libérée par les hémocytes ou les cellules musculaires par un mécanisme encore inconnu. Un processus alternatif est décrit chez la limule (**Figure 8**) où elle implique des dégranulations hémocytaires qui déclenchent une cascade de coagulation en réponse au LPS et au  $\beta$ -1,3-glycane (Muta & Iwanaga, 1996). Parmi les composants granulaires, plusieurs zymogènes à activité sérine protéase interviennent en cascade de coagulation. Ainsi, en présence de LPS, l'activation autocatalytique du facteur C déclenche la réaction qui aboutit finalement à la conversion du coagulogène en un gel de coaguline insoluble. Le zymogène du facteur G est activé en présence du  $\beta$ -1,3-glucane (Iwanaga & Lee, 2005). Cette voie de coagulation médiée par le  $\beta$ -glucanes est activée par la surface des champignons. La cascade de coagulation immobilise et engluie les envahisseurs dans l'hémolymphe par la formation d'un caillot. La cascade de la coagulation est régulée par trois inhibiteurs de sérine protéase de type serpine, co-libérés pendant l'activation des hémocytes pour empêcher la diffusion des facteurs de coagulation actifs, ce qui pourrait causer la formation de caillots inutiles. Le dernier mécanisme est identifié chez les insectes, le système de coagulation consiste en quatre étapes (revue par (Theopold, Schmidt *et al.*, 2004) chez les Lépidoptères). Tout d'abord, la dégranulation des hémocytes conduit à l'établissement d'agrégats extracellulaires. Ces agrégats scellent la plaie avec un caillot primaire mou. Deuxièmement, l'activation de la cascade ProPO / transglutaminase aboutit à la réticulation du caillot (caillot dur). Troisièmement, les plasmotocytes sont attirés, et s'infiltrèrent dans le caillot pour sceller le tout à partir de la hémocoèle (formation de croûtes). Et enfin, la régénération de l'épiderme se produit, au niveau de la plaie, remplaçant petit à petit la croûte (Jiravanichpaisal, Lee *et al.*, 2006). Bien que l'activation de ces réactions ne soit pas encore connue, les trois premières étapes sont communes à la formation des nodules et des capsules (Theopold, Schmidt *et al.*, 2004).



### Figure 8. Le processus de coagulation chez les Arthropodes.

La coagulation chez les décapodes se résume à la formation d'un polymère insoluble en une seule réaction enzymatique. La seconde partie de la figure illustre le principe du test biochimique dite de la limule, qui est utilisé pour détecter des endotoxines bactériennes (LPS). La méthode a été développée par (Levin & Bang, 1964) sur la constatation suivante : des traces d'endotoxine coagulent le lysat d'hémocytes du limule américain, *Limulus polyphemus*. Cette réaction de gélification a été largement utilisée comme un test simple et très sensible pour révéler la présence d'endotoxines (LPS). Le test du limulus dépend de la réaction en cascade des protéases indiquées dans la figure. Noté que le système ProPO est coactivé par la cascade de coagulation via des dimérisations avec l'hémocyanine. D'après (Iwanaga & Lee, 2005 ; Jiravanichpaisal, Lee et al., 2006)

## H. Le Lysozyme

Le lysozyme porte une activité enzymatique (EC 3.2.1.17) présente dans une grande variété de cellules, de tissus et de sécrétions, des bactériophages aux mammifères. C'est une glycoside hydrolase capable de cliver les liaisons  $\beta$ -(1, 4) glycosidiques entre l'acide N-acétylmuramique et la N-acétylglucosamine (deux sucres aminés) au sein des peptidoglycanes qui forment les parois des cellules bactériennes (Salton, 1957). La fonction des lysozymes est généralement considérée comme immunitaire par l'intermédiaire de la lyse des cellules bactériennes (Masschalck & Michiels, 2003), des activités antimicrobiennes non enzymatiques (During, Porsch et al., 1999), et l'immunomodulation (Park, Kim et al., 2007). Chez certaines espèces, le lysozyme se trouve également impliqué dans la fonction digestive

après évolution adaptative (McHenery, Birkbeck *et al.*, 1979; Xue, Itoh *et al.*, 2007). En fonction de la séquence d'acides aminés, les lysozymes sont classés en six types, parmi lesquels le type poulet (C), type oie (G) et type invertébrés (I) sont les plus présents dans le règne animal. (Callewaert & Michiels, 2010). Les lysozymes type-I sont considérés comme jouant un rôle important dans l'immunité et la digestion chez les invertébrés. Les lysozymes type-I possèdent une forte activité antimicrobienne contre les bactéries Gram positif et à Gram négatif (Nilsen, Overbo *et al.*, 1999; Xue, Schey *et al.*, 2004; Cong, Yang *et al.*, 2009) et dans un même temps, se trouvent exprimés dans de multiples tissus et des organes (Van Herreweghe & Michiels, 2012). L'expression des lysozymes peut être induite lors des challenges bactériens (Li, Parisi *et al.*, 2008) et (Zhao, Qiu *et al.*, 2010). D'autre part, l'activité du lysozyme a été détectée dans les tissus digestifs d'espèces ayant la capacité d'utiliser des bactéries comme source d'éléments nutritifs (Zobell, 1938; McHenery & Birkbeck, 1985), ce qui suggère que le lysozyme peut fonctionner comme une enzyme digestive. Curieusement, les invertébrés pourraient produire des lysozymes différents pour l'immunité (Itoh, Xue *et al.*, 2007) et pour la digestion (Xue, Itoh *et al.*, 2007), et les lysozymes digestifs de type-I auraient évolué à partir du lysozyme immunitaire par sélection positive (Xue, Hellberg *et al.*, 2010).

Dans le contexte immunitaire, le lysozyme, ainsi que d'autres enzymes comme les phosphatases acides ou alcalines, la  $\beta$ -glucuronidase, les estérases ou encore protéases, sont produites dans le lysosome des phagocytes pour être ensuite déchargé dans le phagosome (Smith, 2001). Le lysozyme est aussi retrouvé dans l'hémolymphe après exocytose (Smith, 2001), chez de nombreuses espèces d'insectes (Ursic-Bedoya, Nazzari *et al.*, 2008) et de mollusques (Van Herreweghe & Michiels, 2012). De même la  $\beta$ -glucuronidase est retrouvée soluble dans l'hémolymphe chez plusieurs espèces de mollusques et la drosophile (Cheng, 1976; Langley, Wilson *et al.*, 1983). On peut donc en déduire que les enzymes protéolytiques interviennent à la fois dans un mécanisme cytotoxique intracellulaire en intégrant le phagosome, et un mécanisme cytotoxique extracellulaire en étant libérés dans l'hémolymphe.

## **I. Les peptides antimicrobiens (AMPs)**

Les peptides antimicrobiens (dont environ 900 sont connus) sont produits à la fois par les protozoaires et les métazoaires (Danilova, 2006). Bien que ces peptides soient très différents, ils contiennent tous des clusters d'acides aminés hydrophobes et cationiques très

conservés pendant l'évolution (Zaslouff, 2002). Ces groupements sont essentiels pour : leur fixation aux membranes bactériennes chargées négativement et, leur intégration dans les phospholipides membranaires pour y former des pores ou directement détruire la membrane (Brogden, 2005). Le principal rôle de ces AMPs est de déstabiliser les membranes des pathogènes afin de les détruire. D'autres peptides sont directement transloqués à l'intérieur de la cellule pour aller cibler des composants bactériens et ainsi augmenter l'effet toxique des AMPs (Brogden, 2005). Des peptides antimicrobiens sont synthétisés dans les cellules phagocytaires chez les annélides (Salzet, Tasiemski *et al.*, 2006), les mollusques, les arthropodes, et les urochordés (Hancock, Brown *et al.*, 2006). La plus grande partie des connaissances actuelles viennent des investigations réalisées sur les peptides antimicrobiens des insectes. Ils sont synthétisés principalement par le corps gras (un équivalent fonctionnel du foie des mammifères) et dans une moindre mesure par les hémocytes, les cellules cuticulaires, les glandes salivaires et l'intestin moyen ainsi que par les structures reproductives (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Plus de 150 peptides antibactériens et antifongiques ou polypeptides ont été ainsi décrits chez ces organismes. Les peptides immunitaires des insectes peuvent servir de molécules d'adhésion cellulaire, dans la régulation de l'activité des récepteurs de surface cellulaire ou voies de signalisation conduisant à l'expression des gènes altérés. La drosophile naturellement infectée par des champignons entomopathogènes est capable d'exprimer de façon différentielle uniquement les peptides antimicrobiens possédant une activité antifongique. Chez la drosophile et d'autres insectes, un homologue de NF- $\kappa$ B a été démontré pour réguler la transcription du gène de peptides antimicrobiens (Hoffmann, Kafatos *et al.*, 1999).

### ***III. Connaissances actuelles de l'immunité innée des bivalves***

Chez les mollusques, et notamment chez les bivalves, les hémocytes sont les seules cellules immunitaires effectrices. L'hémocytose (l'augmentation du nombre des hémocytes circulants (Matozzo, Chinellato *et al.*, 2012)) et la phagocytose incarnent la réponse cellulaire tandis que de multiples facteurs hémolymphatiques tels que les lysines, les peptides antimicrobiens, les agglutinines, –présents naturellement ou induits– constituent les mécanismes de défense humorale.

L'hémocytose est l'une des premières réponses cellulaires du système de défense de l'hôte contre les agents pathogènes. La variation dans la concentration cellulaire peut résulter soit de la mobilisation des hémocytes des tissus dans le système circulatoire, ou d'un processus hématopoïétique qui change le nombre absolu d'hémocytes circulants. Ainsi, les réponses inflammatoires chez les bivalves peuvent être classées en quelques types morphologiques de base: l'infiltration, la formation de nodulaire et l'encapsulation (De Vico & Carella, 2012).

La réponse inflammatoire infiltrante est caractérisée par un envahissement focalisé ou diffus des tissus lésés par les hémocytes sans preuve d'un comportement de regroupement ou de nodulation (Villalba, Mourelle *et al.*, 1997; Kim & Powell, 2007). L'inflammation diffuse se distingue de l'inflammation focalisée lorsque la zone touchée ne semble pas avoir plusieurs centres d'infiltration d'hémocytes et qu'ils sont abondants et largement diffusés sur une grande partie du tissu (Kim & Powell, 2007). Après avoir infiltré les tissus, l'activité des hémocytes est principalement de phagocyter les agents pathogènes et les débris cellulaires de la zone lésée.

La réponse inflammatoire nodulaire est habituellement observée lorsque de nombreuses petites particules doivent être phagocytées; ainsi, les hémocytes se regroupent, formant des groupes plus ou moins grands, à la fois dans la circulation et dans le tissu interstitiel (Galloway & Depledge, 2001). *In vitro*, le regroupement d'hémocytes est une propriété bien connue de la biologie de ces cellules. Chen & Bayne, en 1995(b) ont suggérés que dans les hémocytes de moules de Californie, *M. californianus*, cette agrégation pourrait être classée en trois niveaux en fonction de la force de l'interaction cellule-cellule: aucune agrégation, agrégation faible, et agrégation cohérente. Chez les invertébrés, la formation de nodules est normalement considérée comme une conséquence de l'agrégation hémocytaire après une provocation bactérienne (Rowley, 1996). Cependant, Auffret & Oubella, en 1997, ont exposé des huitres *C. gigas* à des xénobiotiques identifiés dans un estuaire pollué. Ils ont observé des changements dans le comportement d'agrégation des hémocytes selon le contaminant chimique utilisé et émis l'hypothèse que l'activité d'agrégation de ces cellules peut être modifiée par le stress induit par contamination de l'environnement.

L'encapsulation est une réaction classique de défense immunitaire dirigée vers les corps étrangers, y compris les parasites multicellulaires, qui entrent dans l'hémocoèle et sont trop gros pour être phagocytés (Galloway & Depledge, 2001; Jayaraj, Thiagarajan *et al.*, 2009). De façon générale, une capsule d'hémocytes entoure le corps étranger, et les produits cytotoxiques (par exemple, les enzymes de dégradation et les radicaux libres) sont libérés

dans la cavité formée et détruisent l'envahisseur (Jayaraj, Thiagarajan *et al.*, 2009; Meena, Rose *et al.*, 2010). Des études *in vitro* réalisées chez certains bivalves marins ont suggéré que les hémocytes interagissent préférentiellement ou plus intensément avec les particules dont la surface est chargée positivement, et que des facteurs opsoniques favorisant l'encapsulation sont présents dans l'hémolymphe (Jayaraj, Thiagarajan *et al.*, 2009; Meena, Rose *et al.*, 2010).

Il est à noter un dernier mécanisme, distinct de l'encapsulation : l'inclusion dans la nacre. Une couche de nacre est fixée autour du parasite ou de la particule étrangère qui a envahi l'espace entre la coquille et le manteau (Lutz, 1978). La nacre est formée par la superposition régulière d'une couche protéique et de cristaux d'aragonite (Hattan, Laue *et al.*, 2001). La nacre forme aussi la coquille et sa cristallisation est régulée par différentes protéines (Miyazaki, Nishida *et al.*, 2010).

La défense humorale repose sur la sécrétion, par les hémocytes ou d'autres cellules, de molécules biologiquement actives jouant un rôle dans la défense immunitaire. Pendant la phagocytose, des enzymes hydrolytiques, comme le lysozyme par exemple, sont sécrétées dans l'hémolymphe. Les lectines sont synthétisées et exprimées à la surface des hémocytes comme récepteur aux PAMPs. En réponse aux pathogènes, des espèces réactives de l'oxygène hautement toxiques sont produites par les hémocytes. Plus récemment, des protéines antibactériennes et antifongiques, apparentées aux défensines des arthropodes, ont été identifiées chez *Mytilus*.

Il est maintenant largement admis que la contamination chimique peut moduler le système immunitaire des bivalves (Dyrynda, Pipe *et al.*, 1998; Ciacci, Barmo *et al.*, 2011; Canesi, Ciacci *et al.*, 2012; Mottin, Caplat *et al.*, 2012). Plusieurs tests fondés sur le comptage des hémocytes, la phagocytose, l'activité de certaines enzymes et la mesure des ROS ont été développés pour mesurer la compétence du système immunitaire (Auffret, Rousseau *et al.*, 2006; Duchemin, Auffret *et al.*, 2008) voire pour constituer des biomarqueurs de la pollution environnementale (Livingstone, Chipman *et al.*, 2000). Très récemment, en 2012 une étude portant sur 2 espèces de bivalves : *Chamelea gallina* et *Mytilus galloprovincialis* a permis de mettre en évidence une immunomodulation due au changement climatique global (Matozzo, Chinellato *et al.*, 2012).

## A. Reconnaissance des pathogènes : PAMPs et PRRs

Depuis la création des bases de données répertoriant massivement des séquences nucléotidiques, un certain nombre de transcrits caractéristiques des acteurs moléculaires de l'immunité dans différentes espèces, produits d'un ensemble de gènes parfois appelé immunome (Doytchinova, Taylor *et al.*, 2003), ont été identifiés chez les bivalves. Ainsi les databases EST (Expressed sequence tags) liées à *M.edulis* ont permis d'obtenir 27 séquences nucléotidiques de TLR (Tanguy, Bierne *et al.*, 2008) dont seulement 2 sont complètes et concordent avec l'organisation classique de ces récepteurs (Philipp, Kraemer *et al.*, 2012). La database Mytibase pour *M. galloprovincialis* (Venier, De Pitta *et al.*, 2009) a permis d'identifier 3 séquences MyD88, ainsi que 9 séquences TLR (Toubiana, Gerdol *et al.*). Les 3 séquences de MyD88 identifiées chez *M.galloprovincialis* sont presque identiques à celles déjà isolées chez *M. edulis*. En fait, les bivalves semblent posséder plusieurs gènes codant pour MyD88, 4 sont identifiés chez *C. gigas* et 2 de *P. fucat* (Toubiana, Gerdol *et al.*, 2012) L'existence d'une voie de signalisation NF- $\kappa$ B suspectée chez les bivalves depuis 1999 (Escoubas, Briant *et al.*, 1999) est confirmée en 2013 (Toubiana, Gerdol *et al.*, 2012).

**MyD88** : Protéine adaptatrice impliquée dans la voie de signalisation des récepteurs Toll-like de la réponse immunitaire innée. Il agit avec d'autres adaptateurs (IRAK, TRAF) pour former un complexe d'activation. La kinase activée conduit à la translocation de **NF- $\kappa$ B**, un facteur de transcription de la réponse inflammatoire.

Des fragments de transcrit pour des RLRs (RIG- like receptors, **Tableau 1**), récepteurs sensibles aux ARN étrangers sont retrouvés dans le transcriptome de *M.edulis*, de même que 4 fragments appartenant au LBPs (lipopolysaccharide-1,3-glucan binding proteins). Sept fragments de transcrits codant pour différentes protéines de reconnaissance du peptidoglycane (PGRP, Peptidoglycan recognition proteins) ont aussi été identifiés et présentent un domaine conservé PGRP/amidase2 ainsi que 3 fragments différents de GNBPs, (Gram-negative binding proteins). La présence de ces fragments laisse supposer que ces récepteurs existent sans pour autant que leur expression protéique soit actuellement confirmée. Une classe importante de PRR chez les bivalves semble être les lectines associées à la membrane (Sharon & Lis, 2004). Nous reviendrons sur les lectines dans un second temps. D'autres PRRs ne semblent pas présents chez les bivalves. C'est notamment le cas des NOD like receptors (NLRs, **Tableau 1**) (Philipp, Kraemer *et al.*, 2012).

## B. Phagocytose

La phagocytose est considérée comme le principal mécanisme de défense interne chez les invertébrés. Les hémocytes de la plupart des espèces de bivalves étudiées à ce jour possèdent une capacité phagocytaire (Wootton, Dyrinda *et al.*, 2003b; Tanguy, McKenna *et al.*, 2013). Les éosinophiles granuleux sont les phagocytes les plus actifs dans plusieurs espèces de bivalves (Foley & Cheng, 1975; Lopez, C. *et al.*, 1997; Pipe, Farley *et al.*, 1997). Les hémocytes de bivalves peuvent ingérer une grande variété de particules : bactéries, algues, levures, cellules sanguines et corps étrangers comme les sphères de latex (Wootton, Dyrinda *et al.*, 2003b).

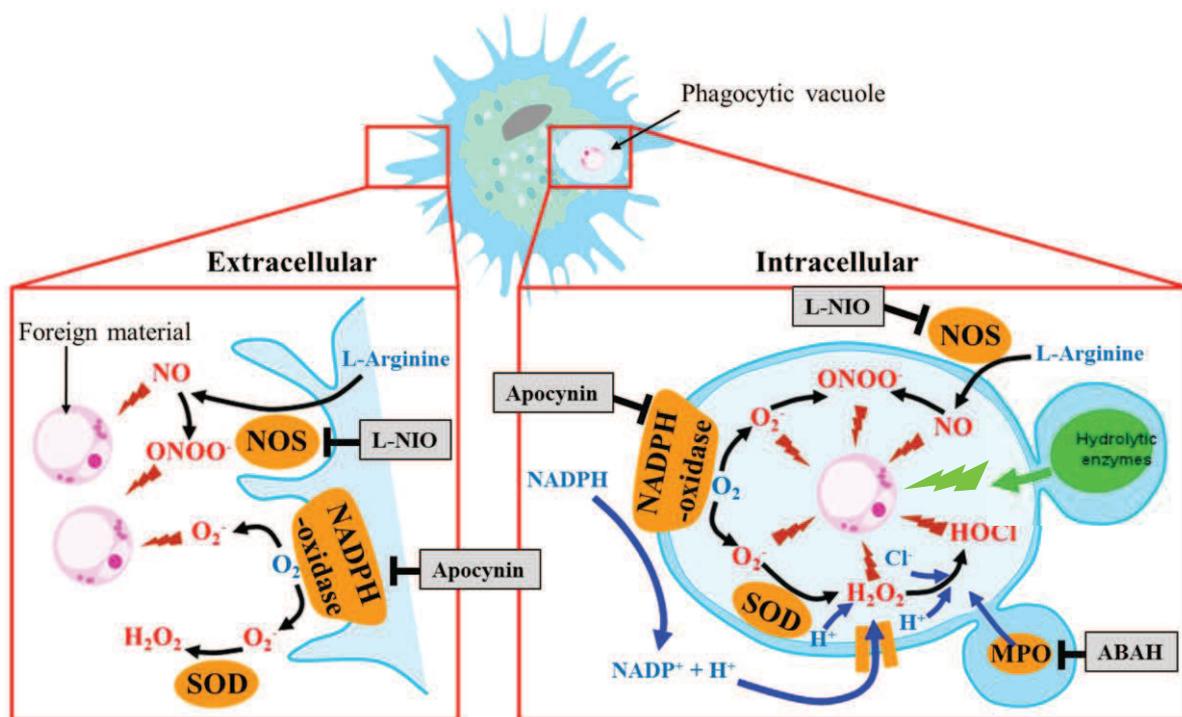
Bien que la reconnaissance et la fixation des particules étrangères pendant la phagocytose soient partiellement basées sur des propriétés physico-chimiques telles que la charge de surface ou le caractère hydrophobe (Olafsen, 1986), l'observation des réponses différentielles aux diverses particules phagocytées *in vitro* indique que les molécules de reconnaissance spécifique sont également impliquées. Chez les bivalves, des molécules de reconnaissance induisant la phagocytose sont en partie des lectines qui peuvent être associées à la membrane cellulaire. Elles permettent une fixation directe ou après opsonisation via un récepteur adéquat (Wootton, Dyrinda *et al.*, 2003b).

Différentes activités enzymatiques hydrolytiques libérées dans le phagolysosomes ont été identifiées chez les bivalves, telles que les  $\beta$ -glucuronidases, les phosphatases alcalines et acides, le lysozyme, les lipases, les arylsulphatases et les estérases non spécifiques (Carballal, Lopez *et al.*, 1997a; Wootton, Dyrinda *et al.*, 2003b). En outre, des peptides antimicrobiens sont acheminés de leurs granules de stockage vers le phagosome. Si l'infection devient systémique, les lysozymes et les peptides antimicrobiens sont relâchés dans le plasma (Mitta, Hubert *et al.*, 1999; Mitta, Vandenbulcke *et al.*, 2000b; Canesi, Gallo *et al.*, 2002; Tincu & Taylor, 2004; Pruzzo, Gallo *et al.*, 2005).

## C. Action cytotoxique, production de ERO et ERN

L'activité du stress oxydatif a été documentée chez plusieurs espèces de bivalves (Roch, 1999) incluant les palourdes *R. decussatus* (Tafalla, Gomez-Leon *et al.*, 2003), les coquilles Saint-Jacques (*P. maximus*), les huîtres (*C. virginica* et *C. gigas*) (Villamil, Gomez-Leon *et al.*, 2007) et les moules *M. galloprovincialis* (Arumugam, Romestand *et al.*, 2000; Tafalla, Novoa *et al.*, 2002) et *M. edulis* (Wootton, Dyrinda *et al.*, 2003b; Akaishi, St-Jean *et*

al., 2007). La production de ROS par les phagocytes de bivalve est généralement accompagnée par la libération d'enzymes de dégradation dans le milieu extracellulaire (Wootton, Dyrinda *et al.*, 2003b). Chez *Mytilus*, les hémocytes produisent des radicaux libres principalement après activation de la voie de la PI 3-kinase (Garcia-Garcia, Prado-Alvarez *et al.*, 2008) à la suite de l'attachement de particules étrangères sur la membrane plasmique des hémocytes. La production des principales espèces réactives de l'oxygène par les hémocytes des mollusques bivalves stimulés s'effectue aussi bien à l'extérieur de la membrane cellulaire qu'à l'intérieur du phagosome (Donaghy, Kraffe *et al.*, 2012). La **Figure 9** reprend et localise les différentes enzymes intervenant dans la production du burst oxydatif.



**Figure 9. La production de ROS par les cellules phagocytaires.**

En dehors de la voie mitochondriale, principales espèces réactives de l'oxygène dans les hémocytes des mollusques bivalves peuvent être produites à l'extérieur de la membrane cellulaire (à gauche) ou à l'intérieur du phagosome (à droite). Les enzymes productrices de ROS sont notées en orange, les ROS en rouge et les inhibiteurs sont localisés dans les boîtes grises. NO, oxide nitrique;  $\text{ONOO}^-$ , peroxy-nitrite;  $\text{O}_2^-$ , superoxide;  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peroxyde d'hydrogène; HOCl, hypochlorite; NOS, oxide nitrique synthase; SOD, superoxide dismutase; MPO, myeloperoxidase. D'après (Donaghy, Kraffe *et al.*, 2012).

L'exposition d'hémocytes *Mytilus edulis* à une souche bactérienne pathogène comme *Vibrio splendidus* LGP32, induit une production de ROS (Tanguy, McKenna *et al.*, 2013). Cette induction liée aux pathogènes est aussi observée chez d'autres espèces de bivalves comme par exemple : *M. galloprovincialis* (Costa, Prado-Alvarez *et al.*, 2009), *C. gigas* (Labreuche, Lambert *et al.*, 2006) ou encore *M. mercenaria* (Buggé, Hégaret *et al.*, 2007). De

même une modulation de la production d'espèce réactive de l'oxygène est observée après exposition aux divers xénobiotiques (Gomez-Mendikute & Cajaraville, 2003; Company, Serafim *et al.*, 2004; Prevodnik, Gardestrom *et al.*, 2007).

Seulement quelques études documentent la production d'oxide nitrique par les hémocytes de mollusques (Roch, 1999). Notamment, le NO<sup>-</sup> induit, suite à l'addition de LPS de *E. coli* à des hémocytes de *Mytilus edulis*, un groupement bactérien accru. Ce groupement bactérien est réduit par l'addition d'inhibiteurs de NO<sup>-</sup>synthétase (Ottaviani, Paeman *et al.*, 1993). Aussi, la production de NO<sup>-</sup> est induite par des challenges de *M. galloprovincialis* avec *Micrococcus lysodeikticus* et *Vibrio anguillarum* (Costa, Prado-Alvarez *et al.*, 2009).

#### **D. Agglutination par les lectines et les FREPs**

Chez les bivalves, plusieurs travaux rapportent la présence de lectines dans l'hémolymphe (Zhang, Wang *et al.*, 2009), associées ou non à la membrane des hémocytes (Tasumi & Vasta, 2007) et liées aux mécanismes de défenses (Fisher & DiNuzzo, 1991; Zhang, Wang *et al.*, 2009). En plus de précipiter les éléments étrangers, elles sont parfois considérées comme des PRRs (Olafsen, 1995; Kang, Kim *et al.*, 2006). L'utilisation de lectines de référence sur les hémocytes de *M. edulis* révèle la présence de glycoprotéines à la surface des hémocytes liant notamment le WGA (*Wheat Germ Agglutinin*), HPA (*Helix Pomatia Agglutinin*) et TPA (*Tetragonolobus purpureas Agglutinin*), mais pas à la Con A (Concanavale A) (Renwranz, Daniels *et al.*, 1985; Wootton, Dyrinda *et al.*, 2003b). Cependant l'étude de 2003 rapporte une opsonisation uniquement chez le couteau commun *Ensis siliqua*, et pas chez *M. edulis* alors des recherches antérieures ont abouti à l'isolement d'une agglutinine humorale avec des propriétés opsoniques (Renwranz & Stahmer, 1983). Quelles que soient les structures pouvant être impliquées dans le processus d'agglutination, il n'est toujours pas établi si l'agglutination immobilise simplement les bactéries, ou si l'activité de liaison des lectines sériques (agglutinines) se traduit par une phagocytose accrue et la destruction des bactéries, ou les deux (Pruzzo, Gallo *et al.*, 2005).

La présence des lectines a également été recherchée dans des tissus autres que l'hémolymphe, où elles peuvent participer à des fonctions aussi diverses que la facilitation de symbiose (Bulgheresi, Schabussova *et al.*, 2006; Gourdine, Markiv *et al.*, 2007) ou de l'alimentation de ces organismes filtreurs (Espinosa, Perrigault *et al.*, 2009; Espinosa, Perrigault *et al.*, 2010).

En 2011, Romero et ses collaborateurs ont décrit des séquences codant pour une protéine apparentée au fibrinogène (FREPs) dans la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* (MuFREPs). Ces séquences possèdent le domaine de type fibrinogène probablement impliqué dans la reconnaissance de « l'antigène », mais sans le domaine collagène propre aux ficolines, molécules responsables de l'activation du complément par la voie des lectines. Les auteurs rapportent cependant une activité opsonique de MuFREPs similaire à celle observée avec les ficolines des mammifères. Cette étude rapporte aussi trois autres faits intéressants : l'expression des FREPs est plus importante dans les hémocytes que dans les autres tissus, leur structure coïncide avec une forme soluble pouvant être sécrétée et une grande variabilité de la séquence des MuFREPs au sein et même entre les individus. Ce dernier point est proposé comme un mécanisme inné pour lutter contre les agents pathogènes mais aussi comme un processus moléculaire capable d'une allo-reconnaissance partielle, ainsi que cela a été décrit précédemment pour d'autres invertébrés (Zhang, Adema *et al.*, 2004; Khalturin & Bosch, 2007) (cf. Chapitre 1.I.A). Une seconde étude identifie 7 gènes paralogues codant des FREPs (Gorbushin & Iakovleva, 2011). Tous ont été identifiés chez *M. galloprovincialis*, quatre chez *M. californianus* et deux chez *M. edulis* et présentent des homologies avec la ficolin humaine.

## **E. Les inhibiteurs de protéase**

Les protéines ayant une activité inhibitrice des protéases sont détectées dans les fluides tissulaires de nombreuses espèces (Laskowski & Kato, 1980) y compris chez les mollusques bivalves. Plusieurs études révèlent l'existence d'inhibiteurs de protéases dans l'hémolymphe, notamment des  $\alpha 2$ -macroglobulines. C'est le cas de l'huître creuse *Crassostrea virginica* orientale, l'huître du Pacifique *Crassostrea gigas* (Faisal, MacIntyre *et al.*, 1998), la palourde *Spisula solidissima* (Armstrong, B. *et al.*, 1992), et la mye *Mya arenaria* (Elsayed, McLaughlin *et al.*, 1999), et la coquille Saint-Jacques *Chlamys farreri* (Wang, Song *et al.*, 2009).

L'identification d'inhibiteurs du site actif de protéases chez les mollusques bivalves était jusqu'en 2006 limitée au clonage de gènes codant pour les inhibiteurs tissulaires de la métalloprotéinase (TIMP) homologue de l'huître du Pacifique, *Crassostrea gigas* (Montagnani, Le Roux *et al.*, 2001) et du gène codant pour un inhibiteur de protéase à sérine du pétoncle, *Argopecten irradians* (Zhu *et al.*, 2006). Les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases (TIMPs) sont des inhibiteurs de protéase principalement impliqués, dans

les remaniements de la matrice extracellulaire. Depuis des inhibiteurs de protéase à serine ont été identifiés chez *Crassostrea virginica* (Xue, Waldrop *et al.*, 2006) et *Mytilus californianus* (Xue, Itoh *et al.*, 2009)

Il a été montré, chez l'huitre et à plusieurs reprises, une régulation de l'expression des TIMPs lors d'invasion par des pathogènes. L'expression des gènes codant pour les TIMPs est induite par des dommages de coquilles et des challenges bactériens avec un mélange de *V. anguillarum*, *V. metshnikohii* et *Vibrio S322* (Montagnani, Le Roux *et al.*, 2001; Montagnani, Avarre *et al.*, 2007) mais pas avec *V. aestuarianus* (Labreuche, Lambert *et al.*, 2006). D'autres espèces de *Vibrio*, telles que *V. tubiashii*, *V. splendidus* et *V. cholerae* induisent une production de métalloprotéinases pendant l'infection des larves de *C. gigas* mais leurs effets sur ces dernières diminuent avec l'âge (Hasegawa, Lind *et al.*, 2008; Hasegawa, Gharaibeh *et al.*, 2009).

## **F. Le système ProPhénolOxydase**

Cette mélanisation défensive est très documentée chez les arthropodes, mais l'est beaucoup moins chez les mollusques bivalves où son rôle n'est pas compris. L'enzyme phénoloxidase a été rapportée dans l'hémolymphe des mollusques bivalves tels que les moules *M. edulis* (Coles & Pipe, 1994) et *Perna viridis* (Asokan, Arumugam *et al.*, 1997), l'huitre *C. gigas*, les coquilles Saint-Jacques *Argopecten ventricosus* (Luna-Gonzalez, Maeda-Martinez *et al.*, 2003), par exemple, sans que la cascade ProPO ne soit fonctionnellement identifiée. Il a été suggéré que la phénoloxidase participe à d'autres fonctions, comme par exemple la formation des filaments du byssus. (Wootton, Dyrinda *et al.*, 2003b). L'enzyme est néanmoins libérée par les hémocytes lorsque les animaux sont stimulés par une blessure physique ou une contamination biologique (Asokan, Arumugam *et al.*, 1997; Luna-Gonzalez, Maeda-Martinez *et al.*, 2003).

## **G. La coagulation hémostatique**

Chez les bivalves, la coagulation ne semble pas exister macroscopiquement, même si Lopez, C. *et al.*, en 1997, propose que les hyalinocytes pour lesquels aucune fonction n'est clairement documentée, soient impliqués dans l'hémostase. Ainsi chez l'huitre perlière *Pinctada fucata*, les hyalinocytes semblent être impliqués dans les processus de cicatrisation et de coagulation (Suzuki, Yoshinaka *et al.*, 1991). Ils joueraient ainsi le même rôle que les

hyalinocytes de crustacés (Hose, Martin *et al.*, 1990; Clare & Lumb, 1994). Cependant, les bivalves ne possèdent apparemment pas de facteurs de coagulation humoraux, les rapprochant ainsi d'une coagulation du type des insectes (cf. Chapitre 1.II.G

## H. Le lysozyme

L'activité du lysozyme a été détectée dans les tissus digestifs, la glande digestive et le stylet cristallin de bivalves (Olsen, Nilsen *et al.*, 2003; Van Herreweghe & Michiels, 2012). Du point de vue immunitaire, l'enzyme existe dans l'hémolymphe (Pipe, 1990) avec un niveau d'activité plus élevé dans les hémocytes que dans le sérum (Carballal, Lopez *et al.*, 1997a).

## I. Les peptides antimicrobiens

Les premiers facteurs antimicrobiens de mollusques sont décrits dès 1985, chez l'escargot d'abord (Kubota, Watanabe *et al.*, 1985), puis 10 ans plus tard chez *Mytilus* (Charlet, Chernysh *et al.*, 1996; Hubert, Noël *et al.*, 1996). Chez la moule, ces peptides antimicrobiens riches en cystéine sont, pour la plupart, synthétisés et maturés dans les granules des hémocytes (Mitta, Vandebulcke *et al.*, 1999). Les différents peptides identifiés chez *Mytilus* ont été portés dans le

**Tableau 3.** Encore très récemment seules 4 classes d'AMP étaient connues et décrites chez *Mytilus sp.*

### 1. les défensines (Hubert, Noël *et al.*, 1996)

Ce sont des petits peptides dont la séquence montre une forte similitude avec les défensines d'arthropodes. Deux défensines contenant six cystéines ont été caractérisées à partir du plasma de la moule bleue, *Mytilus edulis*, et deux autres chez *Mytilus galloprovincialis*. La position des ponts disulfures liant les cystéines des défensines d'arthropodes est hautement conservée, et ce schéma est identique à celui des défensines A et B de *Mytilus edulis* : 1–4, 2–5, 3–6. C'est un peptide antimicrobien principalement actif sur les bactéries Gram-positives.

### 2. les myticines (Mitta, Hubert *et al.*, 1999)

Ce groupe de peptides contenant 8 cystéines comprend la myticine A et B, qui ont été obtenues et caractérisées à partir des hémocytes (isoformes A et B) et le plasma (isoforme A) de *M. galloprovincialis*. Très efficaces sur les bactéries à Gram-positif, elles le sont beaucoup

moins contre les bactéries à Gram-négatif ou les champignons. En 2008, une nouvelle isoforme de myticine (C) possédant une grande variabilité des séquences est proposée (Pallavicini, Costa Mdel *et al.*, 2008). Les résultats obtenus par (Costa, Dios *et al.*, 2009) ont montré que les séquences individuelles de myticin C sont uniques pour chaque moule, indépendamment de leur origine géographique, âge, sexe, stade de maturation des gonades ou même de leur regroupement grégaire. Seuls les animaux appartenant à la même famille partagent des séquences de myticin C. L'analyse comparative de l'ADN génomique et des séquences d'ADNc provenant du même individu ont montré que toutes les variantes détectées partagent une homologie très élevée avec les isoformes génomiques les plus fréquentes. Ceci suggère que toutes les variantes ont été générées à partir des séquences les plus courantes, par un mécanisme encore non déterminé (Costa, Dios *et al.*, 2009).

### 3. les mytilines (Charlet, Chernysh *et al.*, 1996)

Ces molécules sont remarquablement riches en cystéine par rapport à leur taille relativement petite (huit résidus pour une masse de 3,7 kDa), ce qui conduit à l'hypothèse que leur structure tridimensionnelle est très compacte. Ce groupe, est composé de cinq isoformes (A, B, C, D et G1). Les isoformes A et B ont été isolés du plasma de *M. edulis*, (Charlet, Chernysh *et al.*, 1996) et les isoformes B, C, D et G1 des hémocytes *M. galloprovincialis* (Mitta, Vandebulcke *et al.*, 2000a). Les mytilines affichent un large spectre d'activité antibactérienne et antifongique selon les isoformes, certaines sont plus efficaces sur les bactéries Gram-positives et d'autres sur les bactéries Gram-négatives.

### 4. le mytimycine (Charlet, Chernysh *et al.*, 1996; Sonthi, Toubiana *et al.*, 2011)

Jusqu'à présent peu d'études ont été consacrées à cette classe. Un seul peptide a été partiellement caractérisé chez *M. edulis* et complètement chez *M. galloprovincialis*. Ce peptide semble posséder une activité strictement antifongique (retarde la croissance de *Fusarium culmorum* - un phytophage – et de *Neurospora crassa* – un saprophyte).

Depuis aout 2011, 2 nouvelles classes font leur apparition grâce aux nouvelles méthodes de séquençage ainsi qu'à la base de données de transcrit Mytibase (Gerdol, De Moro *et al.*, 2012):

### 5. les big défensines (Gerdol, De Moro *et al.*, 2012)

Initialement décrit chez la Limule (Saito, Kawabata *et al.*, 1995) ce peptide possède une activité antimicrobienne et antifongique. Classiquement les big-défensines sont des peptides incluant une région N-terminal hautement hydrophobe et une région C-terminale

chargée positivement, riche en cystéine. Les ponts disulfures des 6 cystéines sont arrangés de la façon suivante : 1–5, 2–4, 3–6 dans le peptide mature. La partie N-terminal est plus active sur les bactéries Gram-positives alors que la partie C-terminal est plus active sur les bactéries Gram-négative. Chez *Mytilus* seuls des transcrits ont été identifiés.

6. **les macines (mytimacines)** (Gerdol, De Moro *et al.*, 2012)

Les macines sont des peptides chargés positivement d'abord décrits chez les annélides, et caractérisés par une matrice de ponts disulfures de 8 cystéines. Un modèle mécanistique précise son interaction avec les membranes bactériennes, induisant une agrégation et des changements morphologiques des cellules microbiennes qui précèdent la perméabilisation complète et leur destruction. Chez *Mytilus* seuls des transcrits ont été identifiés.

	Nombres d'isoformes	Lieu de détection	Espèces	References	Activité dominante
Défensines	2	plasma	<i>M. edulis</i>	Charlet <i>et al.</i> , 1996	Antibactériennes (Gram +)
	2	plasma et hémocytes	<i>M. galloprovincialis</i>	Hubert <i>et al.</i> , 1996 Mitta <i>et al.</i> , 1999b	
Mytilines	2	plasma	<i>M. edulis</i>	Charlet <i>et al.</i> , 1996	Antibactériennes (Gram + et -)
	4	hémocytes	<i>M. galloprovincialis</i>	Mitta <i>et al.</i> , 2000 a, b	
Myticines	2	plasma et hémocytes	<i>M. galloprovincialis</i>	Mitta <i>et al.</i> , 1999a	Antibactériennes (Gram +)
	1 (C) Polymorphisme	Manteau, hémocytes en faible quantité	<i>M. galloprovincialis</i>	Pallavicini <i>et al.</i> 2008	Par analogie: Antibactériennes (Gram +)
Mytimicines	1	plasma	<i>M. edulis</i>	Charlet <i>et al.</i> , 1996	Antifongique
Big defensines	8	Tous tissus excepté hémolymphe. Exprimé spécifiquement	<i>M. galloprovincialis</i>	Gerdol, De Moro <i>et al.</i> 2012	Antibactériennes (Gram + et -)
Mytimacines	5	Tous tissus excepté hémolymphe. Exprimé spécifiquement	<i>M. galloprovincialis</i>	Gerdol, De Moro <i>et al.</i> 2012	Antibactériennes (Gram +)

**Tableau 3. Les peptides antimicrobiens chez *Mytilus sp.***

*La plupart des peptides antimicrobiens identifiés chez Mytilus possèdent plusieurs isoformes et sont sécrétés dans le plasma. Les big defensines et les mytimacines sont absentes de l'hémolymphe. L'activité notée en gris est une activité déduite par les auteurs mais non testée.*

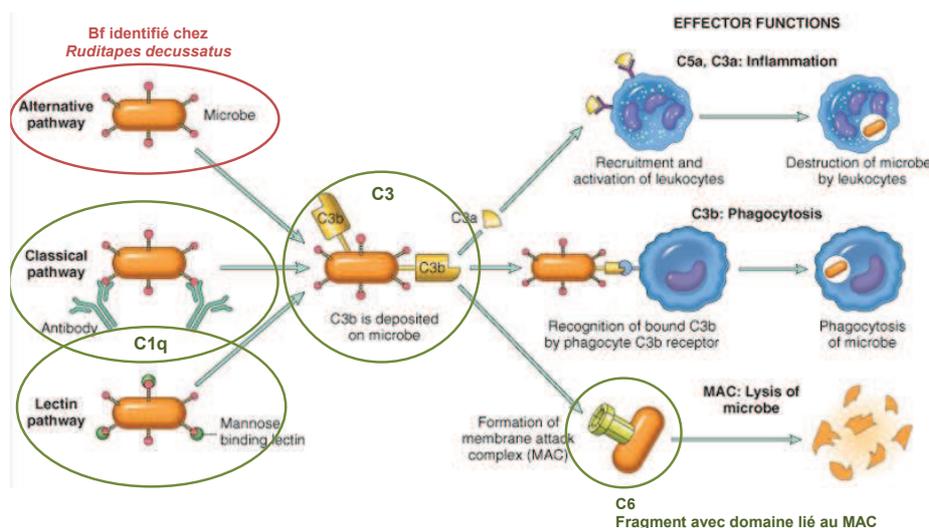
## J. Le système du complément

Le système du complément est un ensemble de réactions pro-inflammatoires de l'immunité innée, participant activement à la destruction microbienne. L'analyse du génome des 2 espèces modèles que sont la drosophile et *Caenorhabditis* révèlent l'absence des acteurs moléculaires du système du complément. Cette observation a conduit à l'hypothèse que la voie du complément est une fonction gagnée par les organismes supérieurs (Nonaka, 2011). Or, des résultats récents impliquant les analyses génomiques et transcriptomiques d'autres invertébrés, indiquent plutôt une perte évolutive de gènes anciens (Nonaka, 2011). En effet, des séquences d'ADN et de l'ARNm du facteur C3 du complément, qui est l'élément central des trois voies du complément connu (classique, alternative, lectine) (**Figure 10**), ont été rapportées chez plusieurs invertébrés tels que des Cnidaires, la limule ou encore les Tuniciers (Philipp, Kraemer *et al.*, 2012). De même l'identification d'orthologues à C3 chez le céphalopode *Euprymna scolopes* (Castillo, Goodson *et al.*, 2009) et le bivalve *Ruditapes decussatus* (Prado-Alvarez, Rotllant *et al.*, 2009) a montré la possibilité d'un système du complément chez les mollusques. Dans le transcriptome de *M. edulis*, deux fragments possédant une grande similitude avec le facteur C3 du complément ont pu être identifiés (Philipp, Kraemer *et al.*, 2012). Un autre gène présentant des niveaux d'expression élevés peu de temps après injection des bactéries Gram + ou Gram -, notamment dans les hémocytes, a été identifié chez *M. galloprovincialis* (MgC1q) très récemment (Gestal, Pallavicini *et al.*, 2010).

Les auteurs rapportent que les séquences MgC1q analysées dans les moules au niveau intra-et inter-individuelles sont extrêmement diversifiées, non seulement au niveau génomique, mais aussi au niveau de l'ADNc. Une telle variabilité rappelle la diversification des molécules de reconnaissance du pathogène déjà observé dans le mollusque gastéropode *Biomphalaria glabrata* (Zhang, Adema *et al.*, 2004). Classiquement, C1q est connue pour être la protéine de reconnaissance cible de la voie classique du complément, en jouant un rôle crucial dans l'immunité adaptative (Medzhitov & Janeway, 2002; Bohlsón, Fraser *et al.*, 2007). De même, C1q, grâce à sa capacité de liaison aux molécules de surface des agents pathogènes, est

**Système du complément :** cascade inflammatoire faisant partie de la réponse immunitaire innée (**Figure 10**). Il a trois activités physiologiques essentielles: (i) la défense contre les infections microbiennes en déclenchant la production d'un complexe membranolytique et d'opsonines qui interagissent avec les récepteurs de surface pour promouvoir la phagocytose. (ii) un pontage entre immunité innée et adaptative (iii) l'élimination des complexes immuns et les produits de la lésion inflammatoire. Trois voies d'activation sont connues avec comme protéine centrale C3 : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. (Gasque, 2004)

également capable d'activer la voie des lectines (Gestal, Pallavicini *et al.*, 2010). Cependant, C1q est également considérée comme un PRR, capable de se lier directement à des agents pathogènes en engageant une large gamme de PAMPs par l'intermédiaire de son domaine-C1q, ce qui déclenche une phagocytose rapide et améliorée (Bohlon, Fraser *et al.*, 2007). Les analyses fonctionnelles chez les mollusques sont encore rares et demandent une enquête plus approfondie. Les bases de données concernant *M. edulis* et celles des autres mollusques, ne rapportent par exemple aucun des autres éléments centraux de la cascade du complément des mammifères (Bf, C2, C4, C5). Seul le facteur B (Bf), un composant de la voie alternative, est décrit pour le bivalve *Ruditapes decussatus* (Prado-Alvarez, Rotllant *et al.*, 2009) dans des travaux contestés par d'autres chercheurs (Nonaka, 2011). En ce qui concerne le complexe multimérique d'attaque membranaire (MAC), acteur final de ce système formé des protéines C6, C7, C8 et C9, seul un fragment présentant des similitudes avec le facteur du complément C6 est présent chez *M. edulis* (Philipp, Kraemer *et al.*, 2012). L'absence de membres du MAC chez *M. edulis* va de paire avec l'analyse du transcriptome / génome d'autres invertébrés marins (Castillo, Goodson *et al.*, 2009). Toutefois, le transcriptome contient 19 fragments présentant un domaine lié au MAC qui pourraient appartenir au système du complément (Philipp, Kraemer *et al.*, 2012). Comme le rappellent Philipp et Kraemer, les données actuelles corroborent l'hypothèse de Nonaka : un système fonctionnellement apparenté au système du complément des vertébrés pourrait, chez les protostomiens, impliquer des acteurs moléculaires très différents (Nonaka, 2011).



**Figure 10. Les trois voies du système du complément.**

L'activation des voies classiques, alternes ou de la voie des lectines aboutit au clivage de C3 en C3a et C3b. C3b permet l'activation du MAC et promeut la phagocytose. C3a joue le rôle d'une cytokine en recrutant les leucocytes. Les éléments ou les fragments identifiés chez *Mytillus* sont cerclés en vert. D'après (Kumar, Abbas *et al.*, 2012)

## ***IV. Immuno-modulation chez Mytilus edulis***

### **A. Challenges bactériens**

Les bivalves filtreurs comme les moules, les huîtres et les palourdes abritent généralement une communauté d'organismes commensaux, opportunistes ou pathogènes composés d'endoparasites tels que *Mytilicola* et *Urastoma*, de protozoaires tels que *Bonamia*, *Haplosporidium* *Marteilia*, *Perkinsus spp.*, de bactéries, du genre *Nocardia* et *Vibrio*, et de virus : herpès et entérovirus (Elston, 1997; Thompson, Austin *et al.*, 2006; Francisco, Hermida *et al.*, 2010). Les espèces microbiennes participent aux cycles biogéochimiques et certaines d'entre elles sont appelées à jouer un rôle probiotique chez leurs hôtes (Petersen, Zielinski *et al.*, 2011). Chez les *Vibrio*, petits bacilles hétérotrophes Gram négatifs largement représentés, des exemples d'associations allant du mutualisme à la pathogénicité sont rapportés chez les animaux. *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et 9 autres espèces de *Vibrio* provoquent des symptômes bénins ou graves chez l'Homme tandis que d'autres *vibrio* halophiles qui se reproduisent dans les eaux saumâtres et marines peuvent grandement affecter les mollusques, les crustacés et les poissons (par exemple *V. tapetis*, *V. alginolyticus*, *V. splendidus*, *V. pectenocida*, *V. harvey*, *V. penaeocida*, *V. anguillarum*) (Thompson, Austin *et al.*, 2006). Sous l'influence de facteurs environnementaux tels que la température, la salinité ou des polluants, des éléments de cette « flore » peuvent envahir et coloniser l'hôte conduisant éventuellement à des foyers infectieux ou à la mort de l'individu, en particulier chez les larves de bivalves: naissains et juvéniles, naturelles ou d'élevage (Samain & McCombie, 2008; Francisco, Hermida *et al.*, 2010). (Babarro & de Zwaan, 2002) ont démontré l'effet de l'anoxie, induite par le développement d'une flore bactérienne anaérobique, sur la mortalité des *Mytilus edulis* aux Pays-Bas. Contrairement aux huîtres et aux palourdes, aucune mortalité apparente, et moins de pathologies ont été signalées dans les moules (Gestal, Roch *et al.*, 2008; Watermann, Herlyn *et al.*, 2008). Il est plus probable que *Mytilus spp.* est un réservoir d'agents infectieux pour les organismes aquatiques et les humains, puisque, par exemple, ils tolèrent des quantités importantes de *V. alginolyticus*, *V. parahemolyticus* et autres *vibrio* (Lhafi & Kuhne, 2007). Chez *Mytilus* aucun virus n'a été rapporté comme pathogène, même si des virus ont récemment été suspectés d'être responsables de la maladie des branchies (Smolarz, Wołowicz *et al.*, 2006).

L'exposition de *M. edulis* à diverses souches bactériennes plus ou moins virulentes : *V. splendidus* LGP32, *V. splendidus* LGP32  $\Delta$ vsm et *V. splendidus* 7SHRW (une souche environnementale) laisse apparaître très clairement une immuno-modulation spécifique du pathogène. Les souches virulentes *V. splendidus* LGP32 induisent toutes les deux *in vitro* un effet sur l'adhésion des hémocytes, la phagocytose et la flambée oxydative. Alors que la souche environnementale induit une réponse plus faible et retardée des hémocytes. (Tanguy, McKenna *et al.*, 2013)

## B. Modulations abiotiques

Au-delà de la relation hôte/pathogène qui, implique une immuno-modulation chez *Mytilus edulis*, de nombreuses études ont révélé que les facteurs environnementaux, biotiques (Munari, Matozzo *et al.*, 2011; Matozzo, Chinellato *et al.*, 2012) ou abiotiques modulaient la réponse immunitaire. Voici quelques exemples d'études *in vitro* de l'immuno-modulation rapportés chez *Mytilus sp.* via : les métaux lourds (Sauve, Brousseau *et al.*, 2002; Duchemin, Auffret *et al.*, 2008 ; Ciacci, Barmo *et al.*, 2011), les composés organiques (Canesi, Ciacci *et al.*, 2007 ; Canesi, Lorusso *et al.*, 2007a), PCB, HAP (Canesi, Ciacci *et al.*, 2003; Wootton, Dyrinda *et al.*, 2003a) ou l'œstrogène par exemple (Canesi, Ciacci *et al.*, 2006; Canesi, Lorusso *et al.*, 2007b), les nanoparticules (pour revue (Canesi, Ciacci *et al.*, 2012)), (Canesi, Ciacci *et al.*, 2008; Canesi, Ciacci *et al.*, 2010; Kadar, Lowe *et al.*, 2010 ). De nombreuses études visant à évaluer l'impact des composés sur les organismes ont fait appel à la mesure de la phagocytose, pour ne citer que quelques publications se référant à la phagocytose chez *Mytilus sp.* à la suite d'une exposition chimique : (Canesi, Lorusso *et al.*, 2005; Hagger, Depledge *et al.*, 2005; Auffret, Rousseau *et al.*, 2006; Canesi, Ciacci *et al.*, 2006; Akaishi, St-Jean *et al.*, 2007; Canesi, Lorusso *et al.*, 2007b; Duchemin, Auffret *et al.*, 2008; Ciacci, Barmo *et al.*, 2011).

Tableau 4 reprend quelques études explorant l'altération de la fonction immunitaire après exposition *in vitro*, à des métaux lourds, des composés organiques ou des nanoparticules chez *Mytilus sp.*

	Références	Espèces	Paramètres immunitaires	Résultats	Exposition		
Métaux lourds	Ciacci <i>et al.</i> 2011	<i>M. edulis</i>	Sécrétion du lysozyme Phagocytose Production de NO Stabilité membrane lysosomale	↘	Chrome IV (concentration non toxique)		
	Duchemin <i>et al.</i> 2008	<i>M. edulis</i>	Nombre total d'hémocytes Mortalité hémocytaire Phagocytose	↗ ↗ ↘	Mercure		
	Sauve <i>et al.</i> 2002	<i>M. edulis</i>	Phagocytose (50% d'inhibition)	Concentration des métaux pour EC-50 Hg <sub>1</sub> <Ag<Hg <sub>2</sub> <Zn<Cd	Hg <sub>1</sub> : CH <sub>3</sub> HgCl Ag : AgNO <sub>3</sub> Hg <sub>2</sub> : HgCl <sub>2</sub> Zn : ZnCl <sub>2</sub> Cd : CdCl <sub>2</sub>		
Composés organiques	Wootton <i>et al.</i> 2003	<i>M. edulis</i>	Nombre total d'hémocytes Activité acide phosphatase Adhésion des lectines Phagocytose Production de ROS	— ↗ ↘ — —	Phénanthrène (HAP)		
	Canesi <i>et al.</i> 2003	<i>M. galloprovincialis</i>	Sécrétion du lysozyme (stimulé par <i>E.coli</i> )  Clairance bactérienne ( <i>E.coli</i> )	↗ (P47, P77, P128) — (PCB P153)  ↘ (PCB P47)	PCB P47 : 2,2',4,4'-tetrachlorobiphényle P77 : 3,3',4,4'-tetrachlorobiphényle P128 : 2,2',3,3',4,4'-hexachlorobiphényle P153 : 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphényle		
	Canesi <i>et al.</i> 2007; Canesi <i>et al.</i> 2007a; Canesi <i>et al.</i> 2007b	<i>M. galloprovincialis</i>	Stabilité membrane lysosomale Sécrétion du lysozyme Phagocytose Production de NO	Triclosan ↘ ↗ ↗ — ↗	Bezafibrate ↘ ↗ ↘ ↗ — ↗	Gemfibrozile ↘ ↗ ↘ ↗ — ↗	EDC dont E <sub>2</sub> ↘ ↗ ↘ ↗ ↗ (↘ < 25 μM) ↗ ↗ ↗
	Canesi <i>et al.</i> 2008; Canesi <i>et al.</i> 2010	<i>M. galloprovincialis</i>	Stabilité membrane lysosomale Sécrétion du lysozyme Production de ROS et NO	SiO <sub>2</sub> — ↗ ↗	TiO <sub>2</sub> — ↗ ↗	C60 fullerène — ↗ ↗	NCB ↘ ↗ ↗

**Tableau 4. Effets de différents xénobiotiques sur les fonctions hémocytaires.**

Listes non exhaustives d'expositions réalisées en laboratoire chez *Mytilus sp.* EDC : *Endocrine Disruptor Compound*, E<sub>2</sub> : 17β-estradiol, NCB : *nanosized carbon black*, SiO<sub>2</sub> : dioxyde de silicium TiO<sub>2</sub> : dioxyde de titane, ↗ augmentation, ↘ diminution, — aucune variation significative. Tests réalisés exclusivement *in vitro*.

Des facteurs environnementaux saisonniers tels que la température, la salinité, la nutrition et la gamétogenèse peuvent influencer les processus phagocytaires des hémocytes des bivalves (Leah M. Oliver & Fisher, 1999; Delaporte, Soudant *et al.*, 2007). L'activité phagocytaire augmente pendant le développement des gonades et diminue après la reproduction (Delaporte, Soudant *et al.*, 2006; Lemaire, Pellerin *et al.*, 2006). D'autres études *in situ* révèlent aussi des divergences dans les réponses immunitaires d'animaux échantillonnés dans des endroits différents et notamment dans des lieux impactés par la pollution : (Dyrynda, Pipe *et al.*, 1998; Marin, 2005; Auffret, Rousseau *et al.*, 2006).

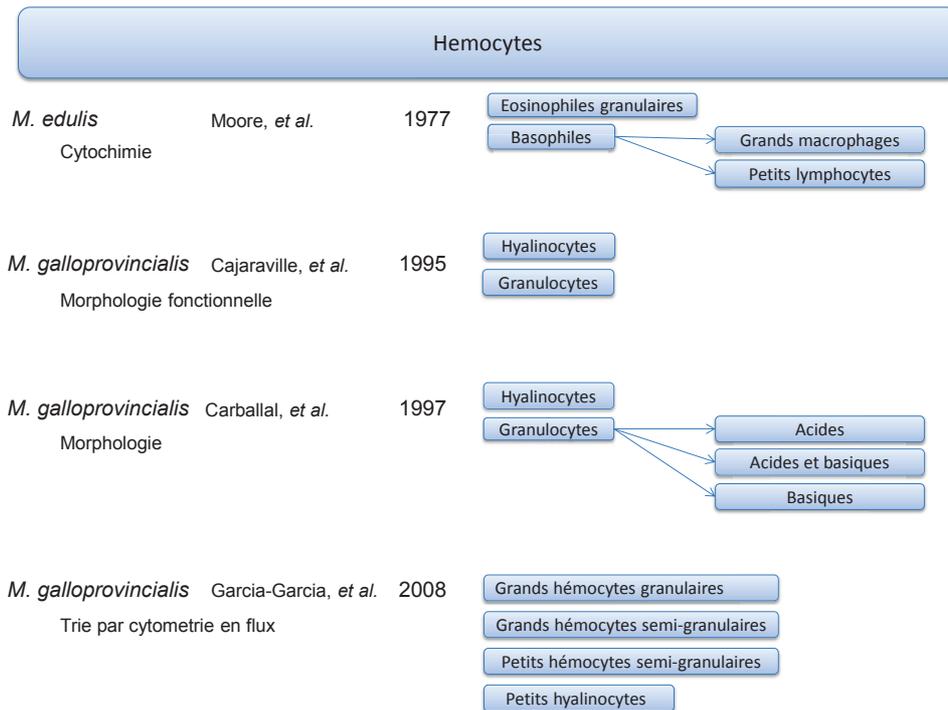
## ***V. Les différents types d'hémocytes et leur origine***

La fonction immunitaire est assurée par des cellules en suspension dans l'hémolymphe de la cavité générale des protostomiens inférieurs ou circulant dans le système vasculaire non endigué chez les invertébrés supérieurs, les mollusques bivalves et gastéropodes ainsi que chez les arthropodes. Dans le premiers cas, ces cellules sont appelées collectivement coelomocytes et dans le second cas généralement hémocytes. Chez les insectes, plusieurs sous-populations hémocytaires sont distinguées à l'aide de marqueurs moléculaires : les cellules granulaires, les plasmacytes, les cellules oenocytoïdes, les sphérulocytes et les coagulocytes (Lavine & Strand, 2002; Theopold, Schmidt *et al.*, 2004; Ribeiro & Brehélin, 2006)

Chez les mollusques bivalves du genre *Mytilus sp.*, une grande diversité cellulaire apparaît à l'examen microscopique des éléments figurés sur un frottis d'hémolymphe. Depuis près de 40 ans, plusieurs sous-populations hémocytaires ont été proposées sur des critères essentiellement morphologiques ou morpho-fonctionnels. Parmi les contributions notables présentées en **Figure 11**, on peut citer celle de (Moore & Lowe, 1977), qui s'appuie sur des critères physiologiques et des activités enzymatiques, leur permettant de séparer les hémocytes en 2 sous populations :

- Les basophiles séparés en 2 : les grands macrophages et les petits lymphocytes.
- Les éosinophiles granulaires

Une autre classification proposée par l'équipe de Carjaraville, en 1995, identifie, chez *Mytilus galloprovincialis*, grâce à des critères purement morphologiques, des granulocytes et des hyalinocytes, cellules ne présentant pas de granules. En 1997(b), Carballal, *et al.* confirme la présence de ces 2 sous populations, toujours chez *Mytilus galloprovincialis*, en s'appuyant, en plus de l'analyse morphologique, d'une mesure du pH cytoplasmique.



**Figure 11. Différentes classifications des hémocytes chez *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis*.**

La littérature apporte plusieurs classifications des sous-populations hémocytaires, sans consensus scientifique. Ici, sont indiquées quatre classifications proposées dans la littérature, à partir d'approches légèrement différentes :

- (Moore & Lowe, 1977) => *Cytochimie*,
- (Cajaraville & Pal, 1995) => *Morphologie fonctionnelle*,
- (Carballal, Lopez et al., 1997b) => *Morphologie*.
- (Garcia-Garcia, Prado-Alvarez et al., 2008) => *Cytométrie en flux avec trieur*

Cependant, il convient d'envisager prudemment les classifications purement morphologiques, du fait *i)* de la déformabilité rapide des hémocytes, *ii)* de l'absence de connaissances sur la nature des tissus hémolymphopoïétiques et sur les filiations ou les éventuels stades de différenciations cellulaires et *iii)* de l'ignorance de la durée de vie des hémocytes.

Plusieurs études ont cherché à séparer et à identifier spécifiquement différentes sous populations hémocytaires au sein du genre *Mytilus*. Pipe *et al.* en 1997, sépare deux populations par des gradients de densités. Des anticorps monoclonaux spécifiques des sous-populations hémocytaires basophiles et éosinophiles ont été générés par Dyrinda *et al.* la même année. Cependant, il est clair qu'ils réagissent aussi avec deux autres sous-populations : les hémocytes granulaires et les hyalinocytes. Plus récemment encore, en 2008, Garcia-Garcia *et al.* propose de cantonner les analyses phénotypiques dans quatre régions morphologiques,

définies en cytométrie en flux sur la base de la taille (FSC) et de la complexité cellulaire (SSC) en analysant post-acquisition sur des hémocytes fixés.

Malgré l'absence regrettée de marqueurs moléculaires à l'image des antigènes de surface utilisés pour constituer les clusters de différenciation utiles au phénotypage immunologique des cellules sanguines et malgré une biologie cellulaire encore très lacunaire, les chapitres 1 & 2 de ce mémoire indiquent que des données sont disponibles pour décrire certaines fonctions, sécrétions et expressions géniques des hémocytes de *Mytilus sp.*

L'organe hématopoïétique est maintenant connu chez de nombreuses espèces d'invertébrés, pour revue générale (Hartenstein, 2006). D'une façon générale, il peut prendre 2 formes. Dans la forme la plus simple, des domaines spécialisés au sein du mésothélium montrent des taux plus élevés de prolifération et d'où bourgeonnent des hémocytes dans la lumière du coelome ou des vaisseaux sanguins. C'est le cas de certains polychètes et d'autres coelomates simples (Hartenstein, 2006).

L'autre mécanisme hématopoïétique plus complexe est retrouvé, par exemple, chez les oligochètes (Hoffmann, Zachary *et al.*, 1979), les arthropodes (Hoffmann, Zachary *et al.*, 1979), les crustacés (Johansson, Keyser *et al.*, 2000) et les ascidies (Ermak, 1976). Dans ces taxons, les cellules souches hématopoïétiques ont quitté le mésothélium et fusionné en un organe hématopoïétique compact appelé organe lymphoïde ou ganglion lymphatique. Ces glandes lymphatiques se composent d'une masse spongieuse de cellules mésenchymateuses, dont beaucoup sont en mitose active et donnent naissance à différents types de hémocytes (Hartenstein, 2006). Il faut toutefois noter que chez la drosophile, les hémocytes proviennent d'origines différentes (Holz, Bossinger *et al.*, 2003). L'hématopoïèse chez la drosophile se déroule en deux vagues, la première durant l'embryogenèse et la seconde dans le tissu spécialisé : la glande lymphoïde (Crozatier & Meister, 2007). Chez les crustacés, les hémocytes sont synthétisés et partiellement différenciés dans le tissu hématopoïétique mais la différenciation terminale aboutissant à des hémocytes fonctionnels n'a lieu qu'une fois libérés dans la circulation (Söderhäll, Bangyeekhun *et al.*, 2003).

Des structures similaires aux glandes lymphatiques ont également été décrites chez les mollusques. C'est le cas pour le gastéropode *Biomphalaria glabrata* avec l'organe de production des amebocytes (APO) (Jeong, Lie *et al.*, 1983), ou pour les céphalopodes avec les « glandes blanches » près des yeux. (Ratcliffe & Rowley, 1981). Chez les bivalves, l'absence de multiplication des hémocytes circulants permet de poser l'hypothèse de l'existence d'un ou de plusieurs sites d'hématopoïèse. Mais ceux-ci n'ont pas encore été clairement identifiés. Deux origines sont proposées, l'une s'appuyant sur un organe spécifique, et l'autre sur le tissu

conjonctif du tractus digestif (Gagnaire, 2005). L'absence de connaissance sur le ou les organes hématopoïétiques des bivalves ne permet pas de conclure sur l'ontogenèse des hémocytes malgré plusieurs propositions revues par Gagnaire dans sa thèse.



## Chapitre 2. Les fonctions hémocytaires

Les hémocytes de mollusques bivalves sont les principaux acteurs cellulaires de l'immunité (Nappi & Christensen, 2005). Mais, d'autres fonctions leurs sont connues telles que la cicatrisation des plaies et la réparation de la coquille, la digestion des nutriments, le transport et l'excrétion (Cheng, 1981; Fisher, 1986; Beninger, Le Pennec *et al.*, 2003). Les hémocytes semblent même intervenir dans le processus général de bio minéralisation de la coquille : des hémocytes spécialisés ont été observés sur le front de de minéralisation, livrant des cristaux intracellulaires de carbonate de calcium, chez l'huître de Virginie *Crassostrea virginica* (Mount, Wheeler *et al.*, 2004). La protéine de matrice coquillaire (shell matrix protein) a été localisée dans les hémocytes et en association avec le collagène sécrété à partir de ces cellules après l'induction de la formation des coquilles (Patel, 2004; Johnstone, Ellis *et al.*, 2008). L'autre implication révélée très tôt dans la littérature est l'accumulation à l'intérieur du lysosome, le transport et l'élimination des métaux (George, Pirie *et al.*, 1978; George & Pirie, 1980; Nigro, Orlando *et al.*, 1992).

L'omniprésence des hémocytes dans les tissus des mollusques ainsi que l'éclectisme de leurs activités, de transport, de structuration/réparation tissulaire et de la lutte contre les pathogènes, implique avec une réelle capacité migratoire. Jusqu'à présent, peu d'études sont réalisées sur la motilité des hémocytes. Les études portant sur ce sujet se réfèrent plus souvent aux résultats d'une migration à la suite d'une exposition à des chimiattractants qu'à la motilité elle-même.

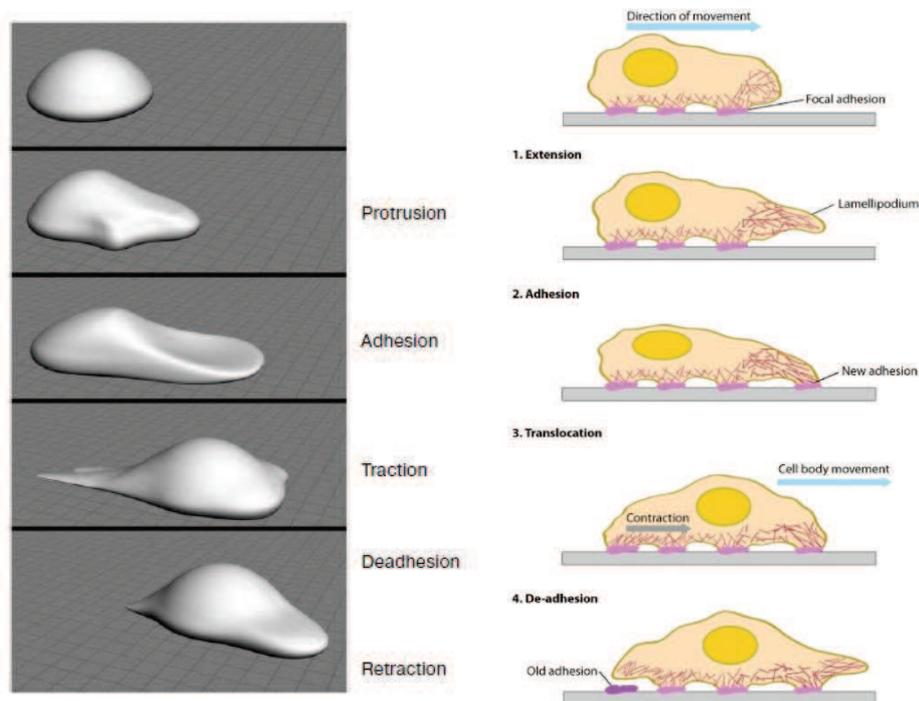
### I. Motilité et migration tissulaire

La migration cellulaire est un terme générique utilisé pour désigner les processus qui impliquent le déplacement d'une cellule d'un endroit à l'autre (Cell Migration Consortium, 2013). Ce phénomène se produit dans des environnements inertes, comme le sol (par exemple, pour l'amibe *Dictyostelium discoideum*), le verre / plastique (De Hauwer, Camby *et al.*, 1997), ou dans des organismes multicellulaires complexes. Les cellules migrent dans différentes situations physiologiques: lors de la recherche de nutriments (pour

**Motilité cellulaire:** capacité physiologique pour une cellule de se mouvoir de manière autonome. La **mobilité**, quant à elle, fait simplement référence au mouvement d'un objet. (Fache, 2005)

les organismes unicellulaires notamment), lors des événements morphogénétiques de l'embryogenèse, de l'organogenèse, de la régénération, et de la cancérogénèse ou encore en réponse à des cytokines dans le cadre de la réponse immunitaire (Lauffenburger & Horwitz, 1996; Huttenlocher & Horwitz, 2011; Vorotnikov, 2011).

Les propriétés intrinsèques des cellules permettent des interactions caractéristiques avec le substrat à l'origine de différents modes de migration cellulaire (Cell Migration Consortium, 2013). La migration cellulaire peut, par exemple, concerner des cellules isolées ou regroupées, être rapide ou lente, dirigée ou aléatoire, amiboïde ou tournante (pour revue : (Friedl & Wolf, 2010)). Il faut cependant distinguer la motilité des cellules en milieu liquide (en 3 dimensions) et la migration cellulaire sur des surfaces rigides (en 2 dimensions). Le premier cas concerne certaines cellules qui sont capables de se déplacer dans un liquide au moyen de mouvements répétitifs de cils ou de flagelles (bactéries, spermatozoïdes, certains protozoaires). Nous ne développerons pas plus en détails ce mode de motilité. Notre intérêt portera sur la migration cellulaire en 2 dimensions, impliquant une adhésion au substrat.



**Figure 12. Différentes phases de motilité cellulaire.**

*Le déplacement cellulaire résulte d'une succession plus ou moins rapide de différentes phases. Elles sont : la protrusion, l'adhésion, la translocation puis retraction avant le désassemblage des structures adhésives. D'après (Vorotnikov, 2011).*

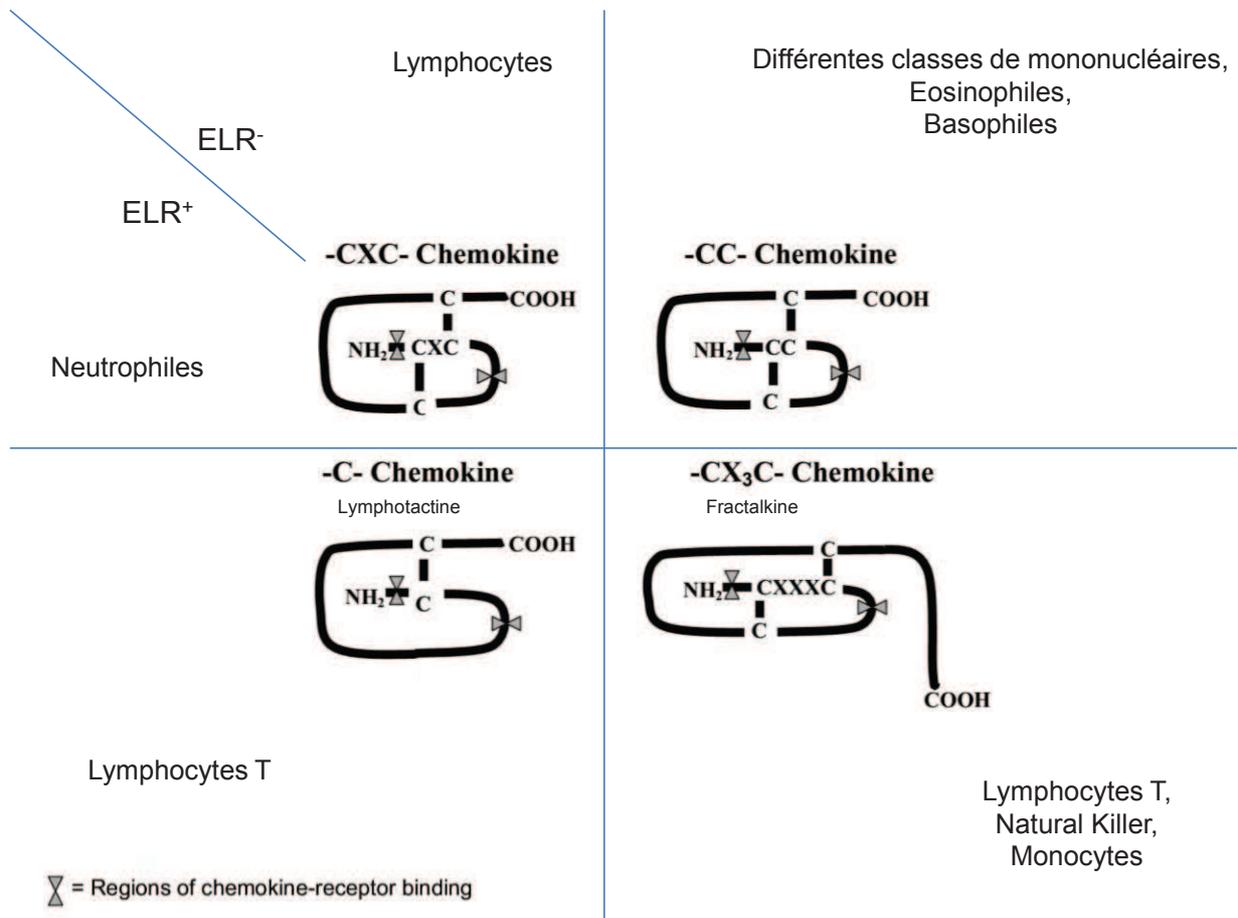
Il est généralement simple d'analyser la migration comme une succession d'événements, souvent régulés par les mêmes effecteurs indépendamment du type cellulaire et du mode de migration. Ils sont la polarisation, la protrusion et l'adhérence, puis translocation

du corps cellulaire et la rétraction de l'arrière (Lammermann & Sixt, 2009). Ces différentes phases sont illustrées dans la **Figure 12**. Ces processus sont intégrés et coordonnés par de vastes réseaux de signalisation transitoire (Vorotnikov, 2011).

Dans ces conditions, la plupart des cellules se déplacent en continu selon un cycle apparaissant souvent saccadé. Ce mode de motilité est clairement observable dans les fibroblastes (Small, Anderson *et al.*, 1996). En revanche, les cellules neutrophiles ou le *Dictyostelium* affichent une motilité amiboïde très glissante avec des phases de transition floues et fondues (Vorotnikov, 2011).

## A. La polarisation

La polarisation de la cellule implique qu'une distinction entre le front de migration et « l'arrière » de la cellule est possible. La polarité est renforcée et même souvent induite par un environnement fournissant un repère directionnel (Bosgraaf & Van Haastert, 2009). Ces facteurs directionnels sont variés. Ils comprennent, entre autres, de petites molécules ou des peptides, classés sous le terme de chimioattractant, et des polypeptides ou des protéines de la superfamille des cytokines, dont le nom reflète leur capacité à induire le mouvement (Kinos) cellulaire (Vorotnikov, 2011). Une sous-famille : les chimiokines, sont un groupe de cytokines chimiotactiques qui sont généralement de petits peptides. À ce jour, plus de 50 chimiokines ont été identifiées chez les vertébrés (pour revue (Townson & Liptak, 2003 ; Le, Zhou *et al.*, 2004)). La superfamille des chimiokines est sous-classée sur la base de l'agencement de résidus cystéines situés dans la région N-terminale, selon une nomenclature C, CC, CXC, et CX<sub>3</sub>C, dans laquelle la lettre C représente le nombre de résidus cystéines et X désigne le nombre d'acides aminés intermédiaires entre les deux premières cystéines (**Figure 13**). La sous-famille CXC est parfois subdivisée en deux, ELR<sup>+</sup> et ELR<sup>-</sup>, en fonction de la présence ou de l'absence d'un motif d'acides aminés (Acide glutamique-Leucine-Arginine) qui précède le premier résidu cystéine de ces chimiokines (Le, Zhou *et al.*, 2004).



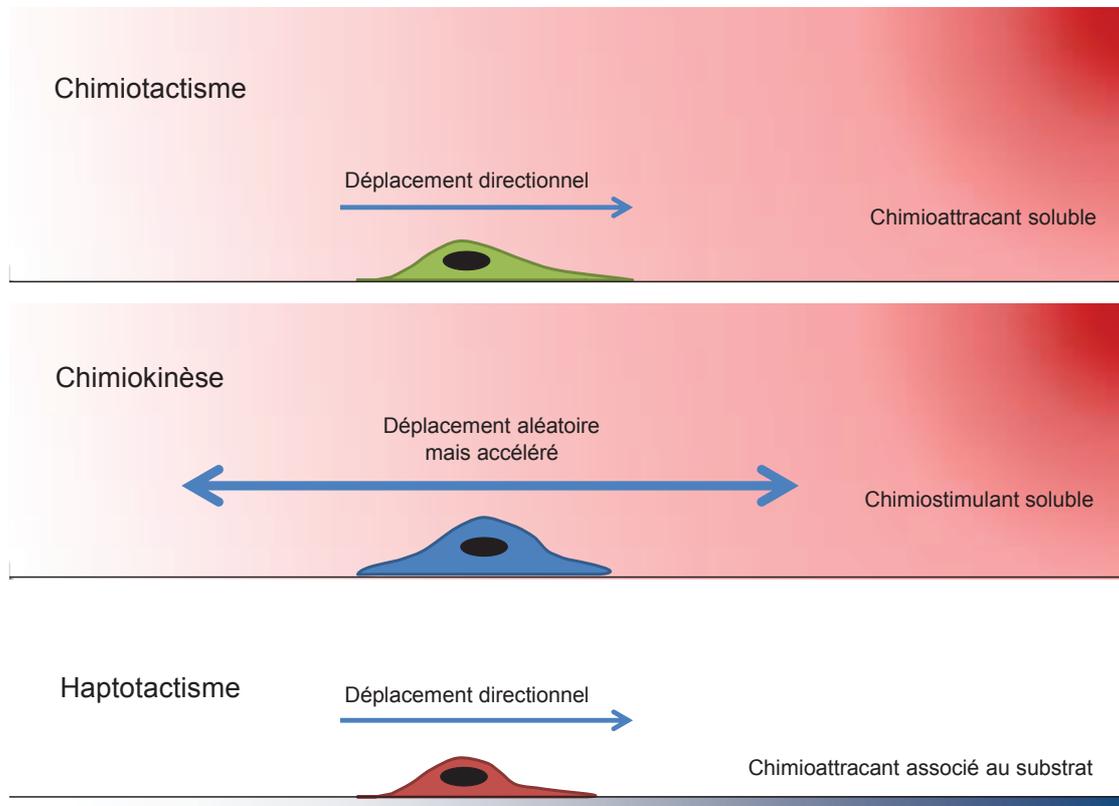
**Figure 13. Les quatre classes de chimiokines chez les vertébrés.**

D'une façon générale, chaque classe de chimiokine attire plus ou moins spécifiquement un type de cellule immunitaire. La structure de base de toutes les chimiokines est très similaire. Les chimiokines se fixent sur des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. ELR : Acide glutamique-Leucine-Arginine. D'après (Le, Zhou et al., 2004) et (Townson & Liptak, 2003)

Ces molécules solubles servent de ligands pour activer les récepteurs chimiotactiques membranaires. Ces récepteurs à sept domaines transmembranaires activent une protéine G qui induit ensuite la transduction du signal. Les familles de récepteurs aux chimiokines sont généralement classées selon les familles de ligands correspondant (les récepteurs CXCR, CCR, XCR et CX<sub>3</sub>CR correspondent respectivement aux chimiokines CXC, CC, C, CX<sub>3</sub>C). Bien que les interactions chimiokine-récepteur soient spécifiques des familles, ce code est dégénéré. De nombreuses chimiokines se lient à plus d'un type de récepteur, et la plupart des récepteurs lient plusieurs chimiokines différentes (Townson & Liptak, 2003).

Le mouvement de cellules dirigées par les composants insolubles de la matrice extracellulaire est connu comme l'haptotaxis (**Figure 14**). Ce type de mouvement est contrôlé par des récepteurs impliqués dans les interactions cellule/substrat et cellule/cellule incluant les

intégrines, cadhérines, les sélectines et les récepteurs et leurs ligands éphrines (Vorotnikov, 2011).



#### Figure 14. Chimiotactie et haptotactie

*Le chimiotactisme et l'haptotactisme permettent un déplacement directionnel en fonction d'un gradient de chimioattractant respectivement soluble ou fixé au substrat. La chimiokinèse est une réponse à des facteurs stimulateurs de la migration cellulaire qui accentuent la motilité sans direction privilégiée de déplacement.*

D'autres facteurs tactiques induisent des réponses plus exotiques du type : durotactique (prenant en compte la rigidité du substrat), méchanotactique (répartition des contacts sur d'autres cellules ou des biopolymères,), thérmotactique (le long d'un gradient de température), phototactique (le long d'un gradient de lumière) ou encore des combinaisons de n'importe lesquels de ces derniers. Lorsque les cellules ne tiennent pas compte de différents facteurs physico/chimiques orientant leurs déplacements mais migrent avec une vitesse augmentée on emploie le terme d'effet chimiokinétique (**Figure 14**).

L'un des premiers évènements moléculaires observable lors de l'initiation de la migration, au moins pour les neutrophiles à la suite d'une stimulation chimiotactique, est l'intense polymérisation de l'actine qui génère une structure de propulsion. La répartition de

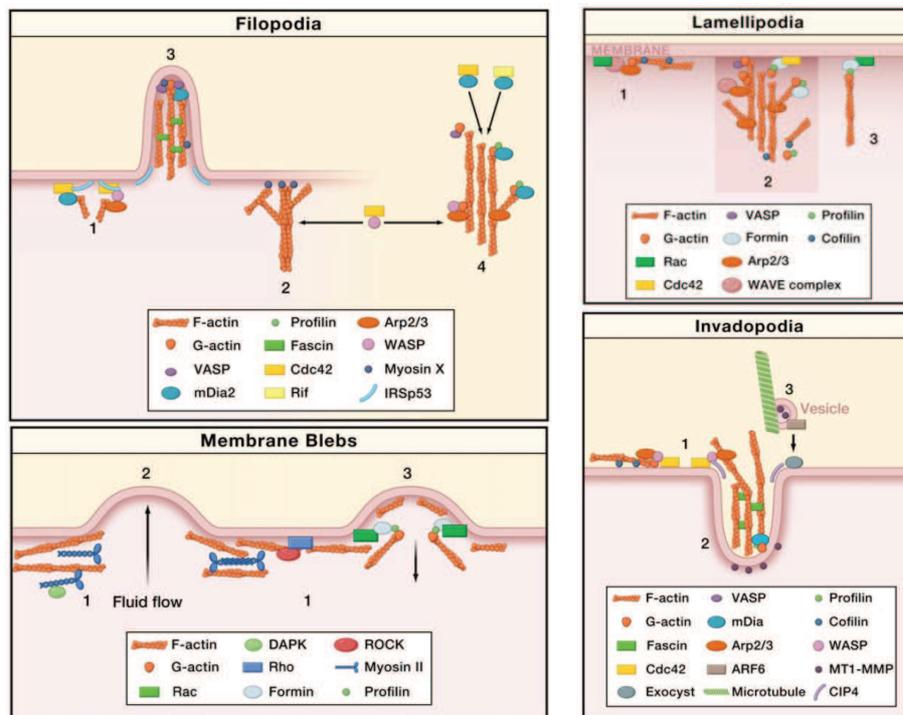
l'actine F passe d'une symétrie azimutale, autour de la cellule, à une concentration au niveau du front avant (Coates, Watts *et al.*, 1992). Des réarrangements moléculaires supplémentaires peuvent s'ensuivre, tels que la redistribution, vers le front de migration, des récepteurs chimiosensoriels (Sullivan, Daukas *et al.*, 1984), des intégrines (Lawson & Maxfield, 1995), et de leurs adaptateurs au cytosquelette (Schmidt, Horwitz *et al.*, 1993). Dans les leucocytes, les phosphoinositides seconds messagers, comme le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PtdIns(3,4,5)P3) et le PtdIns(3,4)P2, se concentrent au niveau du bord d'attaque du fait de la translocation vers le front avant de son enzyme de synthèse, la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et, vers l'arrière de son enzyme de dégradation, la phosphatase PTEN (Affolter & Weijer, 2005 ; Mañes, Gómez-Moutón *et al.*, 2005). La protéine G monomérique CDC42, de la famille des GTPases Rho, agissant par l'intermédiaire des protéines de partitionnement comme PAR-3/6 et protéines kinases telles que la PKC, contribue de manière essentielle à la polarisation motrice (Etienne-Manneville, 2004).

## B. La protrusion membranaire

La protrusion est la formation d'extensions membranaires, ou des protubérances, au niveau du bord d'attaque, dans la direction migration. La protrusion repose sur la dilatation de la membrane plasmique, la formation d'un squelette sous-jacent qui supporte le prolongement de la membrane et l'établissement de contacts avec le substrat, procurant une traction pour le déplacement du reste du corps cellulaire.

Les cellules s'étendent selon quatre modes de protrusion différents présentés dans la **Figure 15**: les lamellipodes, les filopodes, les bourgeonnements (blebs), et les invadopodes pour revue (Ridley, 2011). Chacune de ces structures contribue de manière unique à la migration en fonction des circonstances spécifiques. Par exemple, les lamellipodes peuvent s'étendre sur de longues distances à travers la matrice extracellulaire *in vivo*, en tirant des cellules dans les tissus (Friedl & Gilmour, 2009). Les filopodes explorent les environs de la cellule et sont particulièrement importants pour l'orientation des cônes de croissance neuronaux et les vaisseaux sanguins angiogéniques (Gupton & Gertler, 2007; Eilken & Adams, 2010). Le bourgeonnement de la membrane a été décrit pour conduire la migration des cellules pendant le développement (Charras & Paluch, 2008), et l'invadopode est la protrusion qui permet la dégradation focale de la matrice extracellulaire, probablement pour faciliter l'invasion métastatique à travers les tissus (Buccione, Caldieri *et al.*, 2009). Ces différents types de protrusion peuvent coexister, par exemple, les lamellipodes, les filopodes

et les bourgeons ont tous été observé sur le front avant de la migration des cellules de poisson zèbre pendant la gastrulation (Diz-Muñoz, Krieg *et al.*, 2010).

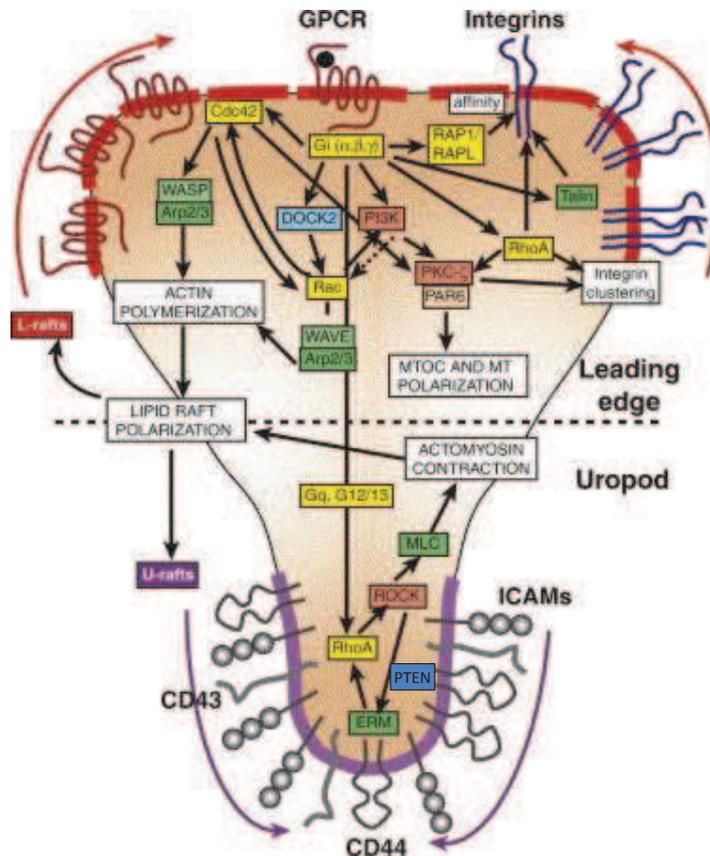


**Figure 15. Les différents modes de protrusion membranaire.**

*Les filopodes et les lamellipodes sont les modes de protrusion les plus fréquemment retrouvés dans les déplacements cellulaires. Ils partagent avec l'invadopode les mêmes acteurs moléculaires. Le bourgeonnement est régulé par des protéines spécifiques comme ROCK ou Rho. D'après (Ridley, 2011)*

Dans les cellules immunitaires motiles, les filopodes et les lamellipodes sont couramment décrits (Mejillano, Kojima *et al.*, 2004). Les filopodes agissent comme mécanosenseurs, ce sont des structures d'exploration, minces et cylindriques dont les projections sont semblables à des aiguilles. Les lamellipodes sont des structures plates, en forme d'éventail, capables de fournir de grandes surfaces qui génèrent la traction pour le mouvement vers l'avant. (Lauffenburger & Horwitz, 1996). Ces deux structures font appel à des acteurs moléculaires communs, canalisant la polymérisation de l'actine (**Figure 16**). La ramification et la polymérisation de l'actine sont entraînées par l'activation du complexe Arp2/3 dont l'activité est réglementée par les Rho GTPases Rac et CDC42 à travers des effecteurs situés en aval comme la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) ou appartenant à la *WASP-family verprolin homologue* (WAVE), famille aussi connue sous le nom SCAR (Parent, 2004; Parsons, Horwitz *et al.*, 2010). Bien que des modèles expliquant la

polymérisation de l'actine soient proposés (Pollard & Borisy, 2003 ; Svitkina, Bulanova *et al.*, 2003), l'orchestration générale n'est pas encore clairement comprise (Ridley, 2011).



**Figure 16. Voies de signalisation de la polarité cellulaire et du chimiotactisme.**

L'activation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) par des chimioattractants est le premier événement dans le chimiotactisme d'une cellule. Les RCPG activés, situés dans des radeaux lipidiques, déclenchent une boucle de rétroaction positive entre Cdc42 et Rac. De concert avec les éléments de régulation WASP / WAVE, cette boucle active les Arp2/3 afin de réaliser une polymérisation de l'actine efficace. Le réarrangement des filaments d'actine conduit probablement à la polarisation des radeaux lipidiques, ce qui améliore la détection de la direction en concentrant les récepteurs et les intégrines chimiosensoriels au front avant. Les RCPG activent aussi des intégrines pour stabiliser les lamellipodes naissants, qui à leurs tours renforcent la localisation de Rac. RhoA activé est localisé à l'arrière, où il favorise la contraction de l'actomyosine en régulant la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC) à travers la ROCK. À l'heure actuelle, il est impossible d'établir un ordre sans équivoque de ces événements. Le jaune indique les GTPases; en orange, les lipides et les protéines kinases, en vert, les protéines de liaison de l'actine et des protéines régulatrices de l'actine. Modifié d'après. (Mañes, Gómez-Moutón *et al.*, 2005).

## C. L'adhésion

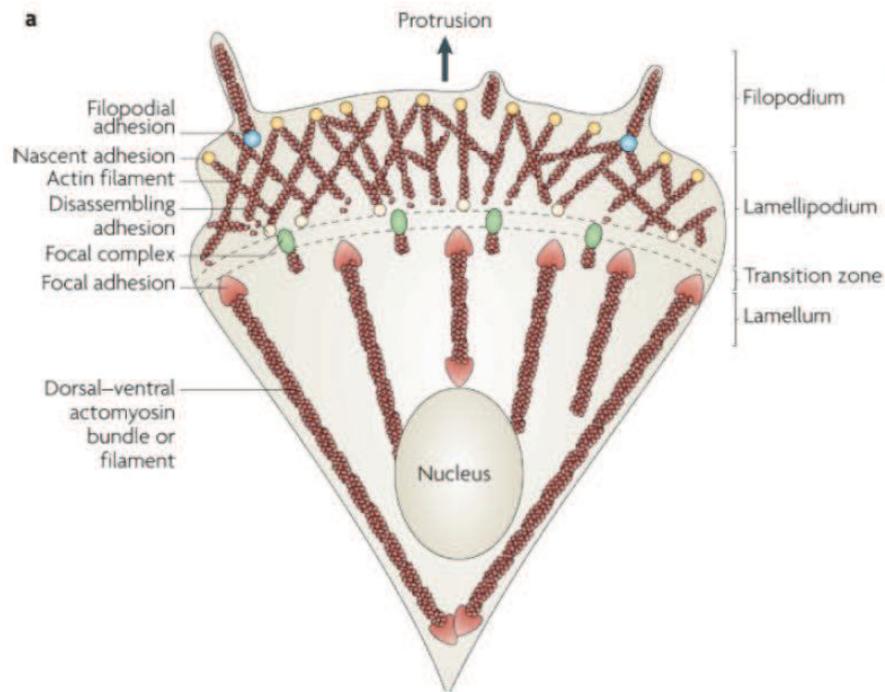
Pour déplacer leur corps cellulaire, les cellules doivent s'ancrer et générer des forces de traction sur le substrat d'attachement. Dans le cas le plus simple, comme le déplacement sur des surfaces planes 2D, les adhérences portant la force de traction font saillie entre l'avant du front de migration et la matrice (Vorotnikov, 2011). Ces adhérences comprennent entre autres des intégrines transmembranaires qui couplent le cytosquelette d'actine à la matrice. Ce couplage permet la traction qui est alors générée par la contractilité du complexe actomyosine (Hynes, 2002). Les forces d'adhérence sont régulées spatialement à l'intérieur de la cellule : de solides attaches sont maintenues à l'avant tandis qu'elles s'affaiblissent à l'arrière où elles peuvent se désengager du substrat. Ces contacts d'ancrage subissent des cycles d'assemblage, maturation, croissance et démontage (Geiger, Spatz *et al.*, 2009; Gardel, Schneider *et al.*, 2010; Parsons, Horwitz *et al.*, 2010). Les adhérences naissantes peuvent avoir un turn-over très rapide d'environ 60 secondes ou bien être stabilisées par la vinculine et la taline en de plus gros points : les complexes focaux. Ces complexes focaux d'environ 1  $\mu\text{m}$  de diamètre sont localisés légèrement en arrière du bord d'attaque, à l'interface lamellipode-lamellum, et persistent pendant plusieurs minutes. Les complexes focaux peuvent continuer à mûrir en de plus grandes adhérences : les adhésions focales ou podosomes. Les podosomes sont généralement des structures d'environ 1  $\mu\text{m}$  de diamètre, qui se trouvent aux extrémités des gros faisceaux d'actine appelés fibre de stress large de 2  $\mu\text{m}$  et de 3 à 10  $\mu\text{m}$  de long, et s'étendant à travers toute la cellule (Zimmerman, Volberg *et al.*, 2004). La **Figure 17** localise les structures adhérentes.

---

**Actomyosine :** *Un complexe de myosine et de filaments d'actine. L'activation du moteur moléculaire myosine conduit à un raccourcissement des filaments et à des mouvements cellulaires induits. (Parsons, Horwitz et al., 2010)*

---

En fonction des propriétés de la matrice, la nature des interactions d'adhésion varie. Les fibroblastes développent des adhérences petites et dynamiques lorsqu'ils sont cultivés sur des substrats mous composés de gélose ou de matrigel, alors que, sur substrats rigides comme le verre ou le plastique, ils présentent des adhérences plus grandes et plus stables (Parsons, Horwitz *et al.*, 2010). Les cellules de la lignée myéloïde, telles que les macrophages, les neutrophiles et les ostéoclastes, forment de petites adhérences très dynamiques qui facilitent leur déplacement rapide sur les substrats et matrices extracellulaires.

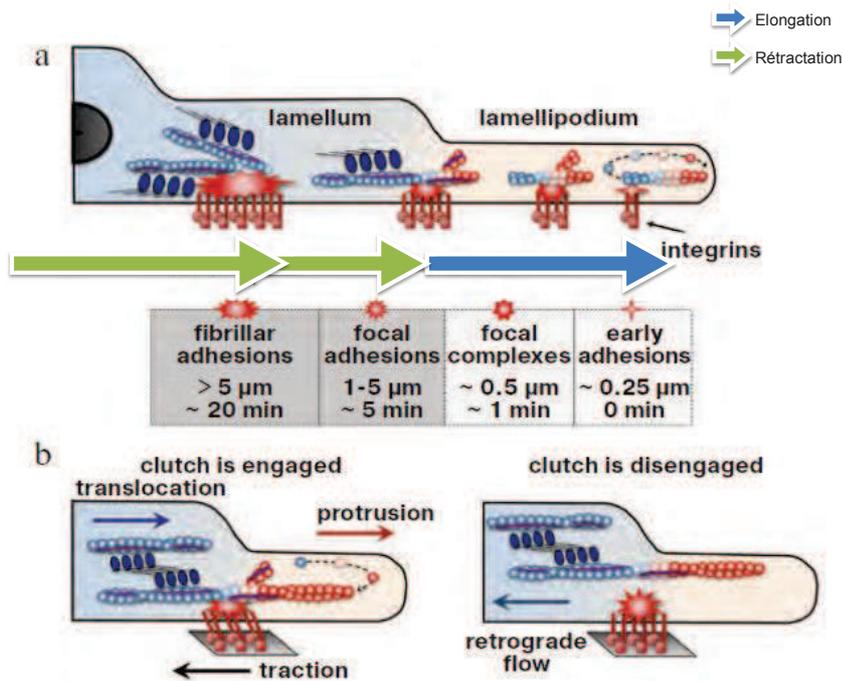


**Figure 17. Localisation des adhésions sur une cellule en migration.**

Dans le lamellipodium, les adhésions des filopodes apparaissent en bleu. Les adhésions naissantes servant de points d'ancrage aux filaments d'actine sont présentées en jaune. Les complexes focaux de la zone de transition sont notés en vert. Les plaques focales d'adhésion ou podosomes sont localisées dans le lamellum et à l'arrière de la cellule, en rouge. D'après (Parsons, Horwitz *et al.*, 2010)

## D. Translocation et rétractation

Bien que d'une importance critique pour la motilité cellulaire, les relations entre le réseau d'actine et les complexes d'adhésion focale sont encore mal comprises (Shemesh, Verkhovskiy *et al.*, 2009; Vorotnikov, 2011). Il est toutefois clair que la myosine II, qui forme le complexe moteur avec l'actine, est exclusivement localisée dans le lamellum et absente des lamellipodes. Les fortes adhésions focales forment, à la frontière de ces deux compartiments, un accouplement entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire par un mécanisme appelé "embrayage moléculaire". Lorsque l'embrayage est engagé, les filaments d'actine sont fixés au point d'adhésion (Vorotnikov, 2011) permettant l'application de deux forces rétrogrades (**Figure 18**). La première de ces forces est la force de résistance de la membrane qui provoque un déplacement de l'actine vers arrière à mesure que celle-ci se polymérise dans les lamellipodes. L'autre force est générée par la myosine II qui est responsable de la translocation de l'arrière de la cellule vers l'avant (Parsons, Horwitz *et al.*, 2010).



**Figure 18. Répartition des forces lors de l’embrayage moléculaire.**

*A, compartimentation de la myosine (représentée par des filaments avec une extrémité globulaire bleue) dans le lamellum et des événements de polymérisation de l’actine dans les lamellipodes en protrusion (en rouge). Les adhésions au substrat augmentent de droite à gauche. B, à gauche, l’embrayage moléculaire est engagé, créant une force de traction vers l’arrière et de translocation vers l’avant du sens de migration. A droite, l’embrayage moléculaire est désengagé. D’après (Vorotnikov, 2011)*

Derrière le front de migration, les fibres de stress interviennent dans la translocation du corps cellulaire en guidant le glissement des filaments d’actine mus par la myosine. Les fibres de stress fournissent ainsi l’armature réorganisant le cytosquelette et permettant le détachement des adhésions (Pellegrin & Mellor, 2007). Les protéines d’ancrage de l’uropode sont généralement prises en charge par endocytose et leurs composants sont transportés le long de la partie supérieure de la cellule vers le lamellum, pour fournir des matériaux de construction pour l’assemblage de nouvelles adhésions (Bretscher, 2008).

Fait intéressant, des intégrines sont parfois perdues et restent ancrées dans le substrat, comme résidus moléculaires derrière les cellules en migration (Palecek, Huttenlocher *et al.*, 1998).

## E. Motilité des immunocytes

Immunité efficace implique que les cellules immunitaires soient au bon endroit au bon moment. La migration est ainsi considérée non seulement comme un moyen de projection vers la zone infectée, mais aussi une activité de surveillance permettant de détecter des pathogènes circulants (Friedl & Weigelin, 2008). Les cellules immunitaires sont attirées par des molécules chimiotactiques extracellulaires (Jin, Xu *et al.*, 2009) et capables de traquer leur « proie » comme a pu le montrer dès les années 1950, David Rogers dans une courte séquence videomicroscopique montrant un neutrophile humain chasser et phagocyter une bactérie mobile, tout en contournant les globules rouges (Roger & Stossel, 1950s) [http://www.youtube.com/watch?v=I\\_xh-bkiv\\_c](http://www.youtube.com/watch?v=I_xh-bkiv_c).

À ce jour, la plupart des connaissances sur la migration des immunocytes en réponse à l'infection provient d'études en culture cellulaire humaine (Dupuy & Caron, 2008; Groves, Dart *et al.*, 2008). Le chimiotactisme a également fait l'objet de travaux extensifs chez l'amibe "sociale" *Dictyostelium discoideum*. Cet unicellulaire se nourrit activement de bactéries par phagocytose, ce qui a permis le décryptage des mécanismes cruciaux et des molécules impliquées aussi bien dans le chimiotactisme que dans la phagocytose (Bozzaro, Bucci *et al.*, 2008; Cosson & Soldati, 2008; Lee, Shen *et al.*, 2010).

Chez les bivalves, relativement peu d'études portent sur la motilité des hémocytes, *per se*. La migration des hémocytes vers des bactéries a toutefois été démontrée *in vitro* chez l'huitre *Crassostrea virginica* (Cheng & Howland, 1979; Ford, Kanaley *et al.*, 1993), la corbicule *Corbicula japonica* (Kumazawa & Morimoto, 1992), la palourde *Tapes decussatus* et *T. philippinarum* (Oubella, Maes *et al.*, 1993), la moule *Mytilus edulis* (Schneeweiss & Renwrantz, 1993) et le clam *Mercenaria mercenaria* (Fawcett & Tripp, 1994). La plupart de ces études reposent sur l'utilisation de chambres de Boyden, permettant de quantifier la migration de cellules de part et d'autre d'une membrane poreuse. La motilité en tant que telle ainsi que sa régulation reste, chez les bivalves, non documentée.

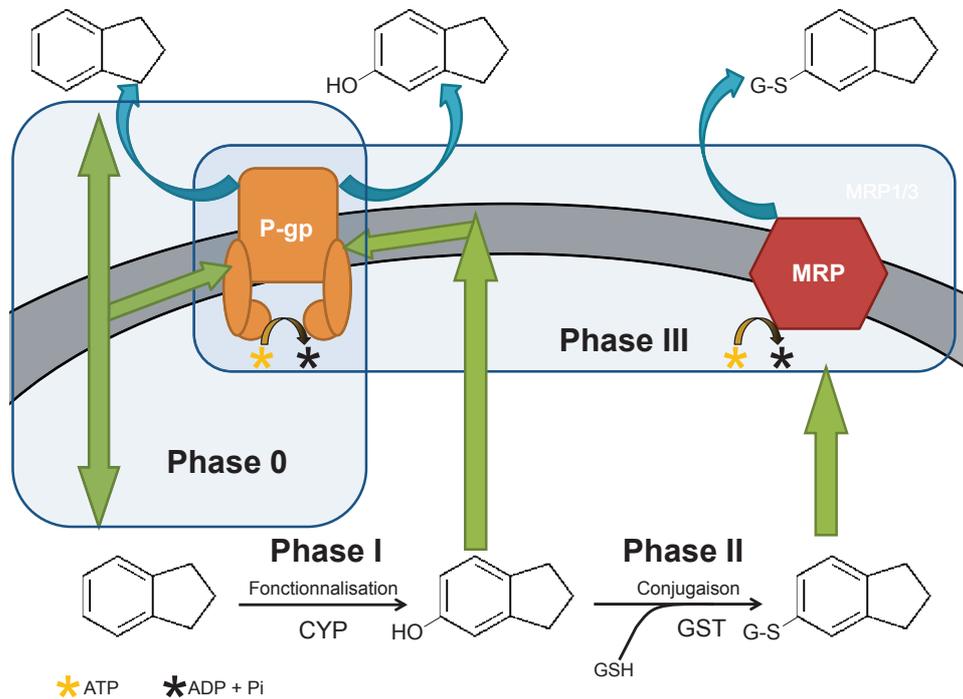
Il faut néanmoins mentionner ici les travaux pionniers de P.S. Davies, T. Partridge et G.E. Jones qui, entre 1972 et 1976, publient une série de quatre articles décrivant les changements rapides de morphologie, l'étalement, le déplacement et l'aggrégation des hémocytes de la patelle *Patella vulgata*, un mollusque gastéropode (Davies & Partridge, 1972; Jones & Partridge, 1974; Partridge & Davies, 1974; Jones, Gillett *et al.*, 1976) et qui utilisent ce modèle pour décrire pour la première fois en 1975 dans la revue *Nature* l'effet inhibiteur de la cytochalasine B sur la motilité (Partridge, Jones *et al.*, 1975). En outre, en

estimant l'adhérence cellulaire directement par comptage et indirectement par mesure de réflectance en épi-illumination, G.B. Stefano montre en 1989 qu'un analogue de la Met-enképhaline, favorise l'ancrage des hémocytes de *Mytilus edulis* sur des lamelles de verre (Stefano, Leung *et al.*, 1989). La même année, à l'aide d'enregistrements en time-lapse sur films argentiques 35 mm synchronisés à un système vidéo, il étudie l'effet d'autres ligands opioïdes sur la surface, la géométrie et le déplacement de ces cellules et en déduit la probable existence d'un sous-type de récepteur opioïde  $\delta$  (Stefano, Cadet *et al.*, 1989). A l'aide d'approches semblables, en calculant le *Facteur de Forme* qui exprime à quel point un périmètre cellulaire s'éloigne de la forme circulaire, la même équipe montre que le LPS, les opioïdes, le TNF $\alpha$  et l'interleukine-1 régulent l'activité des hémocytes, toujours chez *Mytilus edulis* (Hughes, Smith *et al.*, 1991a; Hughes, Smith *et al.*, 1991b). Dans une étude comparative, utilisant des monocytes, des granulocytes et des cellules endothéliales humaines ainsi que des hémocytes de *Mytilus edulis*, il est montré que la morphine s'oppose à l'étalement cellulaire par un mécanisme d'action dépendant du NO (Magazine, Liu *et al.*, 1996). Finalement, en 2000, E. Ottaviani montre que l'interleukine-8 recombinante humaine affecte la forme, le chimiotactisme et la phagocytose des hémocytes de *Mytilus galloprovincialis* (Ottaviani, Franchini *et al.*, 2000).

## **II. La résistance multixénobiotique MDR/MXR**

La présence de composés toxiques a imposé, au cours de l'évolution, la sélection de systèmes de détoxification efficaces, protégeant les cellules des effets toxiques des xénobiotiques et de leurs métabolites. Classiquement, deux stratégies, illustrées en **Figure 19**, sont mises en place : transformer le xénobiotique et l'effluer (Xu, Li *et al.*, 2005). Le premier cas de figure fait intervenir différentes enzymes de biotransformation. Une première phase dite de fonctionnalisation vise à rendre la molécule plus polaire en greffant ou démasquant une nouvelle fonction chimique (-OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH). Cette phase I est catalysée par des enzymes à cytochrome P450 (Bard, 2000). La réaction de phase II est dite de conjugaison. Elle ajoute un radical hydrophile directement sur la molécule native ou sur le produit de la Phase I. Ainsi les composés électrophiles sont conjugués au glutathion (GST) par une Glutathion-S-Transferase (GST) alors que les composés nucléophiles sont associés à l'acide glucuronique par une UDP-glucuronyltransferase (UDP-GST). Cependant, dans certains cas, ces métabolites se révèlent encore toxiques voire plus toxiques. L'efflux fait appel à des transporteurs membranaires prenant en charge directement les xénobiotiques (Phase 0) mais

aussi leurs métabolites (Phase III) souvent plus faciles à éliminer (Marin, 2005; Pasquier, 2011).



**Figure 19. Les différentes phases de détoxification cellulaire.**

*Les flèches vertes indiquent une diffusion passive. Les phases 0 et III effluent tandis que les phases I et II transforment. D'après Bard 2000*

Certains acteurs de ce système d'efflux Phase 0/III sont capables d'induire à eux seuls une résistance cellulaire aux molécules cytotoxiques, qu'elles soient des métabolites endogènes ou qu'elles proviennent du milieu extérieur à l'organisme – molécules qu'il conviendrait alors de nommer xénotoxiques (Brooks & Huggett, 2012).

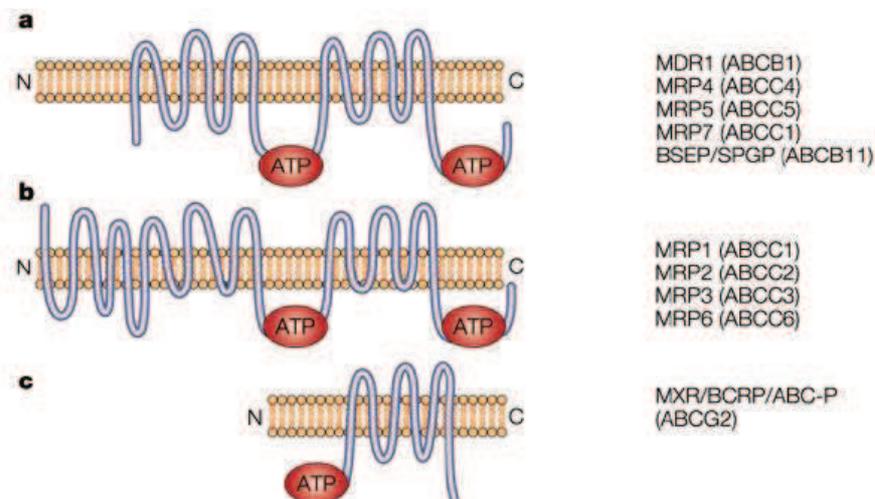
La chimiorésistance fondée sur l'activité d'efflux des transporteurs de Phase 0/III présente une particularité unique : un large spectre. En effet, l'interaction entre les molécules effluées qui prennent le nom d'alloctites (Blight & Holland, 1990; Holland & Blight, 1999) et les protéines de transport, est caractérisée par une faible spécificité moléculaire. La notion de chimiorésistance multiple a été évoquée pour la première fois en 1970 par Biedler et Riehm (Biedler & Riehm, 1970). Ces auteurs ont observé que des cellules cancéreuses de hamster chinois cultivées en présence de doses croissantes d'actinomycine D, développent une résistance à cet agent mais aussi à d'autres molécules non chimiquement apparentées. Le phénotype correspondant a été baptisé MDR pour *Multi Drug Resistance* (Marin, 2005). Le phénotype MDR se distingue donc d'une résistance simple par ses propriétés de résistance croisée à des agents cytotoxiques multiples, de structures et de modes d'action différents

(Goldstein, Galski *et al.*, 1989; Pasquier, 2011). L'origine principale du phénotype MDR est la surexpression de protéines appartenant à la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) et notamment de la P-glycoprotéine (P-gp) première protéine de cette vaste famille, identifiée par Juliano et Ling dès 1976 (Juliano & Ling, 1976). Un nombre très important de revues est consacré au rôle des transporteurs ABC dans le phénotype MDR et dans la résistance aux chimiothérapies anticancéreuses, pour exemples (Higgins, 1992; Bosch & Croop, 1996; Gottesman & Ambudkar, 2001; Ambudkar, Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2003; Sparreboom, Danesi *et al.*, 2003; Hennessy & Spiers, 2007; Callaghan, Crowley *et al.*, 2008; Mizutani, Masuda *et al.*, 2008). Cependant, ces phénomènes de résistance ne se limitent pas aux seules cellules néoplasiques. En effet, des systèmes similaires de lutte contre les xénobiotiques existent chez quasiment tous les organismes, des procaryotes à l'Homme en passant par les végétaux et les champignons (Holland & Blight, 1999; Klein, Sarkadi *et al.*, 1999; Theodoulou, 2000).

Chez différents invertébrés aquatiques, les systèmes d'efflux utilisant les transporteurs ABC participent à la lutte des animaux contre les contaminants chimiques (Pain, 2003). Ce mécanisme a été initialement découvert chez l'anodonte *Anodonta cygnea*, un bivalve dulçaquicole résistant aux xénotoxiques. Dans des expériences utilisant le 2-acétylamino-fluorène, il a été démontré que la radiolisation de cet allocrite est déplacée par l'inhibiteur MDR compétitif de référence, le vérapamil (Kurelec & Pivčević, 1989). Cette propriété distingue les mécanismes de détoxification cellulaire de phase 0/III de ceux reposant sur des protéines de phase I/II. La même approche a été conduite avec succès sur des préparations vésiculaires issues des branchies, du manteau et de la glande digestive de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Kurelec & Pivčević, 1991). Ces observations ont rapidement été complétées par l'identification de transcrits correspondant au gène de la P-glycoprotéine dans des éponges marines et par l'immunolocalisation confocale de leurs produits d'expression au niveau membranaire (Kurelec, Krca *et al.*, 1992). Des mesures bioaccumulation de l'allocrite vincristine dans les branchies de *Mytilus galloprovincialis*, sur des animaux exposés à l'hydrocarbure diesel-2 ou transplantés dans des sites contaminés, ont permis de confirmer le rôle fonctionnel de ces transporteurs dans l'efflux des xénotoxiques chez les moules (Kurelec, 1995b). Ainsi, il a été proposé d'étendre la notion de phénotype de chimiorésistance MDR à celle de phénotype de xenorésistance MXR, *Multi-Xenobiotic Resistance* (Kurelec, 1992).

## A. Les acteurs moléculaires

Les protéines d'efflux responsables du phénotype MDR/MXR appartiennent à la superfamille des transporteurs à ATP Binding Cassette (ABC), remarquablement conservée au sein du monde vivant et caractérisée par des sites de liaison de l'ATP comportant 100 à 200 acides aminés, appelés *Nucleotide Binding Domain* (NBD). Plusieurs centaines d'orthologues sont connus dans le monde vivant (Holland & Blight, 1999). Chez l'Homme, les ABC transporteurs sont regroupés en 8 classes, ABCB1, ABC1-C6 et ABCG2, totalisant 48 produits d'expression (Gottesman & Ambudkar, 2001). La structure minimale d'une protéine ABC est composée d'un site de liaison à l'ATP et de six domaines transmembranaires hydrophobes (**Figure 20**). La protéine BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*), encore appelée MXR pour *MythoXantrone Resistance* ce qui peut porter à confusion dans ce travail, possède cette organisation. Toutefois, la forme retrouvée le plus communément dans ces protéines consiste en un doublement de la structure minimale, c'est-à-dire deux domaines de liaison à l'ATP (NBD1 et NBD2) et 12 domaines transmembranaires. Cette organisation correspond à la P-glycoprotéine chez les Mammifères mais aussi aux protéines MRP4 et 5 ainsi qu'au *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* dont les mutations sont à l'origine de la plus connue des ABCpathies : la mucoviscidose. Enfin, une troisième structure, dite atypique, est rencontrée dans la famille des transporteurs ABC. Celle-ci consiste, en plus de la séquence classique, à l'ajout de 5 domaines transmembranaires et d'une terminaison azotée externe. C'est le cas de la protéine MRP1 (Sparreboom, Danesi *et al.*, 2003).



**Figure 20. Structure générale des transporteurs ABC.**

*A, structure typique à 12 domaines transmembranaires. B, structure atypique à 5 domaines transmembranaires supplémentaires en position N-terminale. C, structure minimale à 6 domaines transmembranaires. Des exemples protéines correspondantes sont listés à droite.*

Spécialisés dans le transport cellulaire actif, les transporteurs ABC exercent des fonctions physiologiques variées, intervenant notamment dans l'absorption des nutriments, le transport d'ions et de peptides, à l'efflux de produits dommageables pour la cellule ou encore à la signalisation cellulaire (Klein, Sarkadi *et al.*, 1999 ; Pain, 2003; Pasquier, 2011). Au sein de cette superfamille, certaines classes sont plus connues, c'est le cas des P-glycoprotéines et des MRP que nous allons voir plus en détail.

### **1. ABCB / P-glycoprotéine**

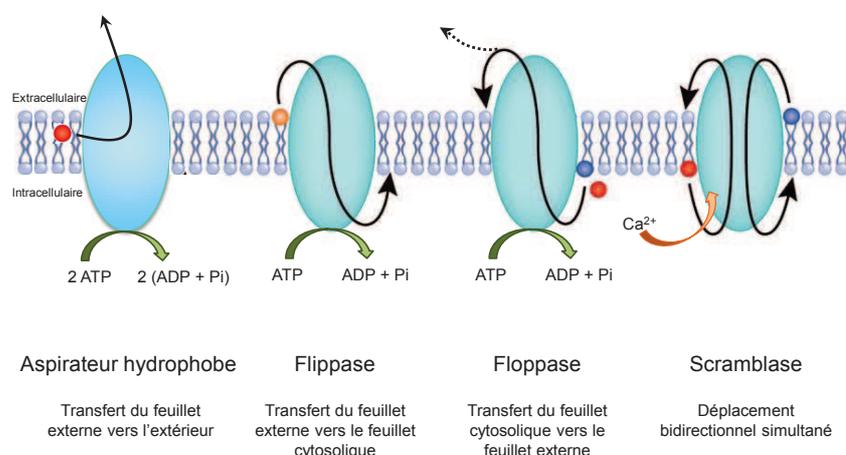
La P-gp est très certainement le transporteur ABC le mieux connu et le plus étudié chez les mammifères. C'est en 1976 que Juliano et Ling vont identifier cette protéine transmembranaire glycosylée de 1280 acides aminés et de 170 kDa appelée glycoprotéine P (P pour « permeability ») qui diminue la perméabilité cellulaire vis-à-vis des médicaments (Juliano & Ling, 1976). Chez l'homme, il a été montré qu'il n'existait pas un gène unique codant pour la P-gp mais plusieurs, faisant des P-gp une famille multigénique (Gottesman & Pastan, 1988). Ainsi chez les mammifères, et selon l'espèce, on retrouve au maximum 3 classes de P-gp dont seulement 2 confèrent le phénotype MDR : la classe I et II (Pasquier, 2011). Les P-gp de la classe III sont impliqués dans la translocation de la phosphatidylcholine vers les sécrétions biliaires (Oude Elferink & Groen, 1995). Il est important de noter que, par abus de langage, le terme P-gp est souvent utilisé uniquement pour désigner l'isoforme de classe I. Les auteurs omettent alors de considérer que chez de nombreuses espèces le phénotype MDR classique repose également sur des iso formes distinctes de classe II, qui sont aussi des P-gp (Germann; Sparreboom, Danesi *et al.*, 2003).

Dans la suite de ce manuscrit, le terme P-gp sera exclusivement réservé aux produits des gènes de classe I et II, impliqués dans le phénotype MDR. La P-glycoprotéine est présentée comme une pompe transmembranaire capable d'effluer les cytotoxiques hors de la cellule par transport actif (Pasquier, 2011). Cependant, au vue de la diversité des structures moléculaires prises en charge par ces transporteurs, les modèles classiques de reconnaissance enzyme/substrat ne peuvent pas s'appliquer (Marin, 2005). Néanmoins le recensement des substrats de la P-gp connus fait apparaître trois caractéristiques partagées (Ueda, Taguchi *et al.*, 1997).

- Un faible poids moléculaire, entre 300 et 2000 g.mol<sup>-1</sup>
- Un caractère hydrophobe
- Une structure composée d'un atome d'azote et de deux cycles aromatiques

Plusieurs modèles ont été suggérés pour expliquer le mécanisme d'action de la P-gp. Seuls deux de ces modèles semblent compatibles avec les données récentes concernant la structure de la P-gp : celui de « l'aspirateur hydrophobe » et le modèle « floppase » (**Figure 21**). Le modèle de l'aspirateur hydrophobe propose que la P-gp capte directement les composés insérés dans la membrane plasmique (Raviv, Pollard *et al.*, 1990). Le second modèle envisage la P-gp comme une floppase, transportant les substrats avant qu'ils ne quittent le feuillet interne de la membrane en assurant leur translocation vers le feuillet externe voire directement vers l'extérieur (Higgins & Gottesman, 1992) Ce modèle pourrait expliquer la grande diversité de substrats, mais aussi leur propriété d'être hydrophobe. De plus, cette hypothèse a été renforcée par la découverte du produit du gène *mdr2/ABCB4*, homologue de la P-gp, qui se présente comme une phosphatidylcholine translocase (floppase) (Gottesman, Pastan *et al.*, 1996).

La P-gp est localisée dans la plupart des épithéliums clos par des jonctions serrées (rein, placenta, tractus gastro-intestinal, foie, bronches, barrière hémato-encéphalique...) ce qui est en accord avec son rôle de pompe à xénobiotiques (Pasquier, 2011). Elle est exprimée en grande quantité dans des organes essentiels de métabolisation et d'excrétion des xénobiotiques comme le foie ou l'appareil urinaire (Gottesman, Pastan *et al.*, 1996; Leslie, Deeley *et al.*, 2005). Néanmoins, l'analyse détaillée de sa localisation tissulaire montre que la P-gp se trouve aussi fortement exprimée dans la glande surrénale, les cellules souches hématopoïétiques, les lymphocytes NK, T et B et dans les cellules dendritiques présentatrices d'antigène (Klimecki, Futscher *et al.*, 1994; Randolph, Beaulieu *et al.*, 1998). Cela suggère qu'elle pourrait exercer des fonctions plus diversifiées que la « simple » fonction de pompe (Johnstone, Ruefli *et al.*, 2000).



**Figure 21. Fonctionnement de l'aspirateur hydrophobe et des flipp/flopp/sramblase.** Dans ces modèles, chaque transporteur hydrolyse au moins une molécule d'ATP excepté les scramblases qui utilisent le calcium. Modifié d'après (Clark, 2011)

## 2. ABCC / Multidrug Related Protein

Les MRP appartiennent à la classe C de la superfamille des transporteurs ABC. La plupart des protéines de la classe MRP sont impliquées dans les mécanismes d'efflux actifs (pour revue, (Borst, Evers *et al.*, 2000). Au fil des années, plusieurs protéines MRP ont été mises en évidence. Aujourd'hui, 9 protéines MRP codées par les gènes ABCC1 à ABCC9 ont été identifiées chez l'homme (Litman, Druley *et al.*, 2001).

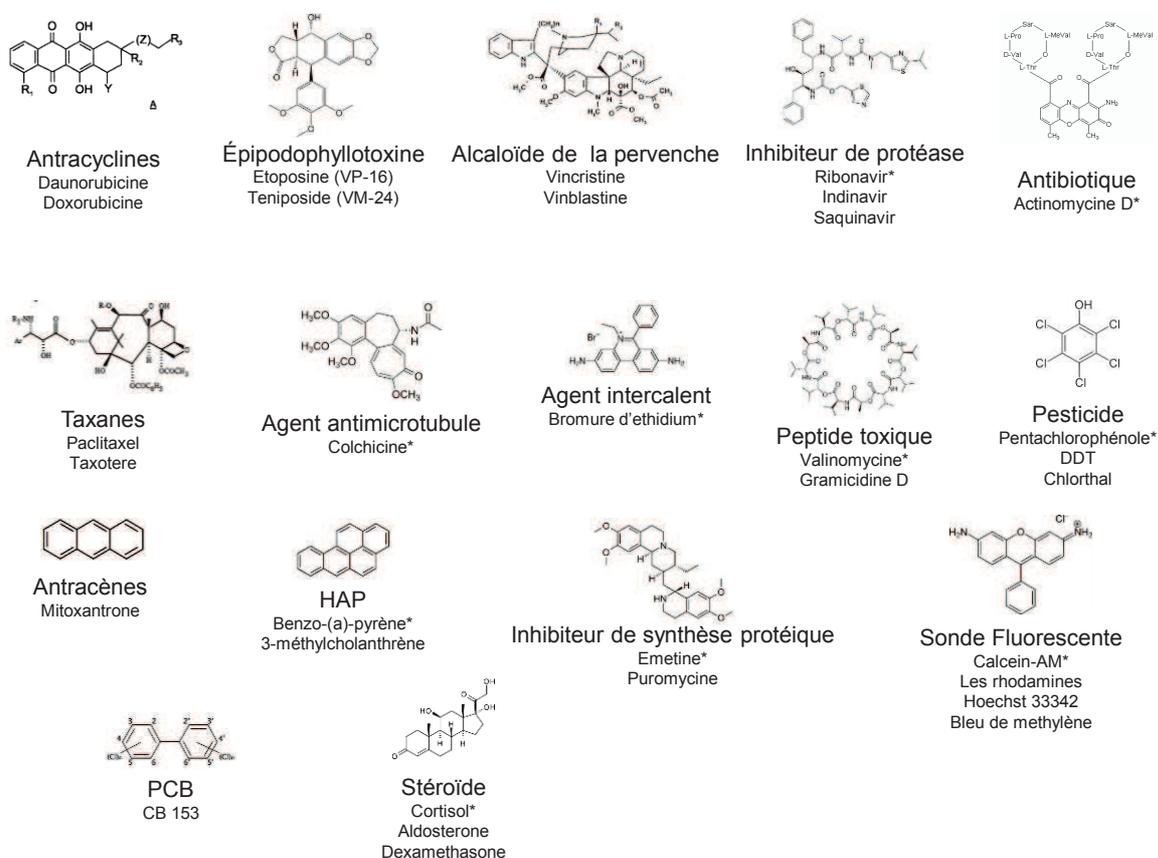
Néanmoins, la protéine MRP1 reste le représentant le plus connu et le plus étudié de cette famille. Elle a été détectée pour la première fois dans une lignée de cellules HL60 présentant un phénotype de chimiorésistance multiple sans expression de la P-gp (Marquardt, McCrone *et al.*, 1990). La protéine MRP1 est une protéine glycosylée de 1522 acides aminés et de poids moléculaire apparent d'environ 190 kDa. Chez l'homme, sa structure présente 15% d'homologie avec la P-gp (Cole, Bhardwaj *et al.*, 1992). Toutefois, à la différence de la P-gp (qui prend en charge des composés organiques cationiques ou neutres) la MRP transporte des composés anioniques, soit natifs soit conjugués au glutathion, aux glucuronates ou aux sulfates voire des complexes métalliques après conjugaison au glutathion (Pain, 2003) ainsi que certains lipides (Raggers, van Helvoort *et al.*, 1999). Les MRP fonctionnent comme une floppase (**Figure 21**) (Zwaal, Comfurius *et al.*, 2004). Différentes études permettent de définir la protéine MRP1 comme une pompe GS-X (Glutathione S- conjugate export) (Akimaru, Kuo *et al.*, 1996 ; Ishikawa, Kuo *et al.*, 1998 ; Krause, Oliveira *et al.*, 2007). L'expression des protéines MRP dans les tissus humains normaux, révèle qu'elle possède un rôle essentiel dans la physiologie cellulaire. Il a été démontré qu'elle transporte notamment des facteurs de médiation de l'immunité (van de Ven, Scheffer *et al.*, 2008) lui conférant ainsi un rôle important dans l'inflammation. Si ces deux protéines sont à l'origine d'un spectre de chimiorésistance sensiblement similaire, elles diffèrent néanmoins par leurs sensibilités aux inhibiteurs (Versantvoort, Bagrij *et al.*, 1995) par leurs affinités vis-à-vis des différents substrats.

### **B. Allocrites et inhibiteurs des transporteurs ABCB et ABCC**

Alors que les substrats endogènes des transporteurs ABCB et ABCC ne sont pas clairement identifiés, il apparait clairement l'existence d'un large éventail de substrat aux natures chimiques différentes. Bien que les transporteurs MRP/ABCC prennent en charge essentiellement des composés conjugués (**Figure 23**), la P-gp efflue plutôt les composés dans

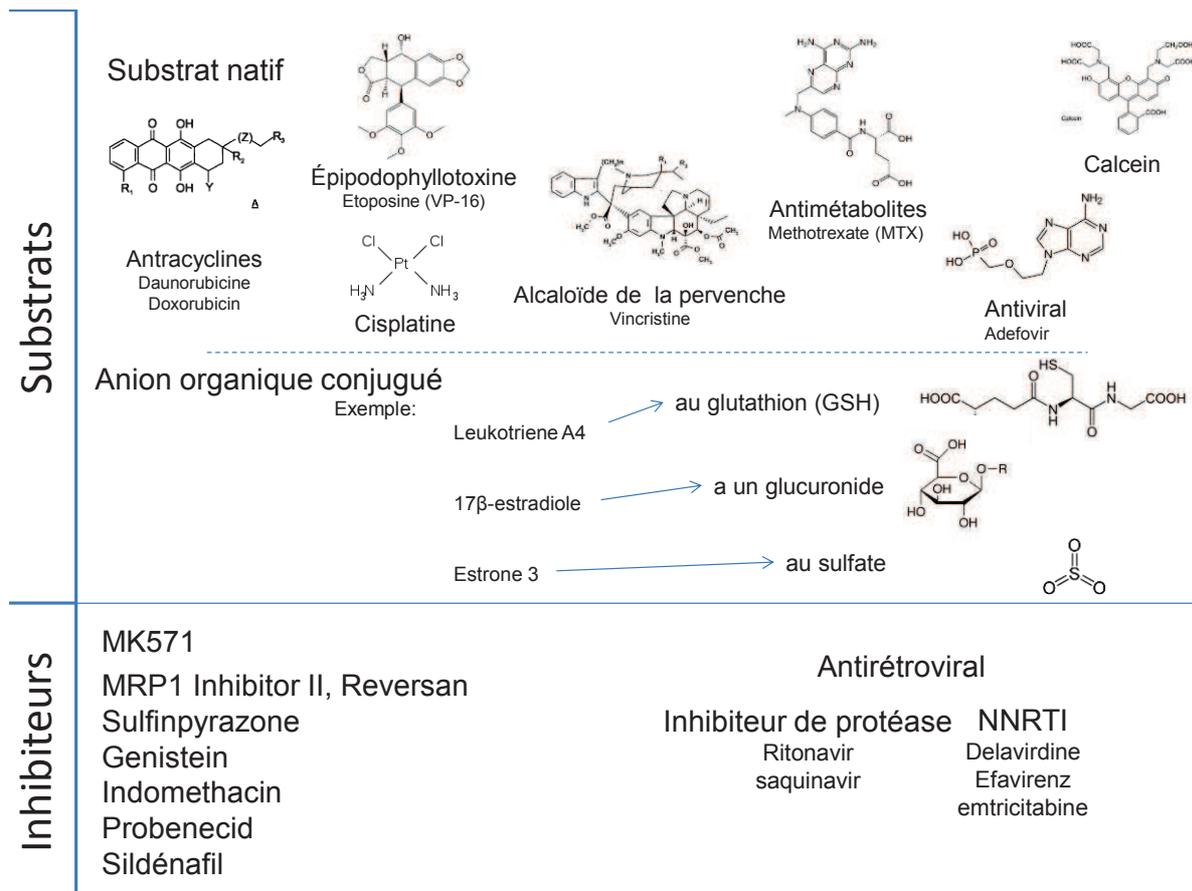
leur forme native. Parmi ceux-ci on peut citer des anticancéreux (vinblastine, vincristine, daunorubicine), des composés altérant le cytosquelette comme la colchicine, des stéroïdes (cortisol, aldostérone), des sondes fluorescentes (rhodamines, calceine-AM), des peptides antibiotiques (gramicidines, valinomycine), des intercalants de l'ADN (bromure d'éthidium), des pesticides (endosulfan, DDT) ou encore des contaminants organiques persistants (HAP, PCB)

**Figure 22.**



**Figure 22. Exemples de composés allocrites de la classe des ABCB/ P-gp.**

Liste non exhaustive de différentes familles de composés substrat de la P-gp. Données compilées d'après les thèses de Pain (2003) et de Marin (2005). Les représentations moléculaires sont, à défaut les structure générales, les structures exactes des composés annotés d'un astérisque.



**Figure 23. Liste non exhaustive de différents allocrites et inhibiteurs de la classe ABC/MRP.**

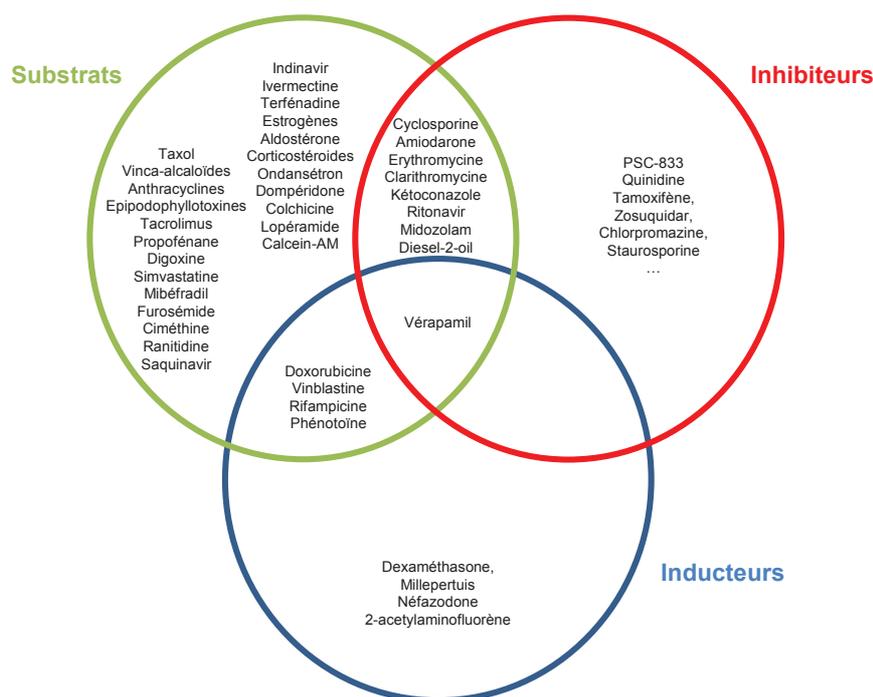
Données compilées à partir de : (Feller, Broxterman *et al.*, 1995; Dallas, Schlichter *et al.*, 2004; Weiss, Theile *et al.*, 2007; van de Ven, Scheffer *et al.*, 2008). NNRTI : Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors

D'un point de vue environnemental comme d'un point de vue pharmacologique, des composés xénobiotiques, parfois xénotoxiques, peuvent inhiber l'activité des transporteurs MDR/MXR, augmentant leurs concentrations intracellulaires et leurs effets délétères sur les cellules et les organismes exposés. Ces composés accroissent la sensibilité des cellules aux cytotoxiques et sont appelés chimiosensibilisants (Kurelec, 1997; Epel, Luckenbach *et al.*, 2008). Les bloqueurs des pompes à efflux sont classés en deux catégories en fonction de leurs mécanismes d'interaction avec les protéines ABC. Les inhibiteurs compétitifs, de forte affinité, sont en mesure de surcharger la capacité de liaison des transporteurs pour allocrites de plus faible affinité. Ceci est considéré comme un risque de potentialisation de l'action des contaminants, notamment devant la grande variété de composés d'origine anthropique dans l'environnement (Daughton & Ternes, 1999). A l'inverse, les chimiosensibilisants non-compétitifs sont des molécules capables de bloquer l'activité ATPase des transporteurs par des

interactions allostériques, supprimant ainsi leur activité de détoxication (Ramachandra, Ambudkar *et al.*, 1998).

La liste des inhibiteurs est peut être tout aussi longue que celle des allocrites simples, d'autant que par définition, les inhibiteurs compétitifs sont aussi allocrites. Cependant, sans être exhaustif certains bloqueurs peuvent être cités: **Figure 24** pour les P-gps et **Figure 23** pour les MRPs.

Il convient aussi de mentionner que certains allocrites sont inducteurs de l'expression génique de la P-gp comme l'illustre la **Figure 24**.



**Figure 24. Allocrites, inhibiteurs et inducteurs de la P-glycoprotéine.**

Liste non-exhaustive des substrats (en vert), des inhibiteurs (en rouge) et des inducteurs (en bleu). Certains composés sont à la fois substrat/inhibiteur, substrat/inducteur, inducteur/inhibiteur, ou les trois à la fois. D'après (Pasquier, 2011)

Quelques substrats sont pris en charge par les deux classes ABCB/P-gp et ABCC/MRP de transporteurs ABC. Il a également été rapporté chez des souris qu'une absence des gènes mdr 1a/b pouvait inhiber l'activité MRP1 (Honig, Fu *et al.*, 2003), soulignant des régulations croisées entre ces différents transporteurs. Ces résultats semblent cependant controversés (Elliott, Raguz *et al.*, 2004). En effet, dans l'évaluation des capacités d'efflux plusieurs difficultés entrent en compte, telles que le chevauchement des spécificités envers les allocrites communs des transporteurs, le recours à l'efflux d'une sonde rapporteuse unique (telle que la rhodamine 123), l'utilisation d'anticorps d'immunodétection potentiellement inhibiteurs (Ghetie, Ghetie *et al.*, 1999) ou encore le recours à des bloqueurs peu spécifiques.

## C. Le phénotype MXR chez les bivalves

Depuis les travaux de Branko Kurelec au début des années 90, le phénotype MXR a été décrit chez de nombreuses espèces d'invertébrés, comme *Caenorhabditis elegans* (Broeks, Janssen *et al.*, 1995), *Carcinus maenas* (Köhler, Lauritzen *et al.*, 1998) ou encore *Drosophila melanogaster* (Wu, Budding *et al.*, 1991). Mais les données acquises sont particulièrement abondantes chez les invertébrés marins et notamment chez les mollusques bivalves et gastéropodes. La fonction reconnue du phénotype MXR chez les organismes aquatiques est la protection contre les toxines naturelles ou anthropiques par l'efflux de ces composés. Pour le moment, chez ces organismes, aucune étude ne s'est penchée sur l'implication des acteurs moléculaires du phénotype MXR dans d'autres fonctions physiologiques, comme c'est le cas chez les mammifères (Pain, 2003; Marin, 2005; Pasquier, 2011 ).

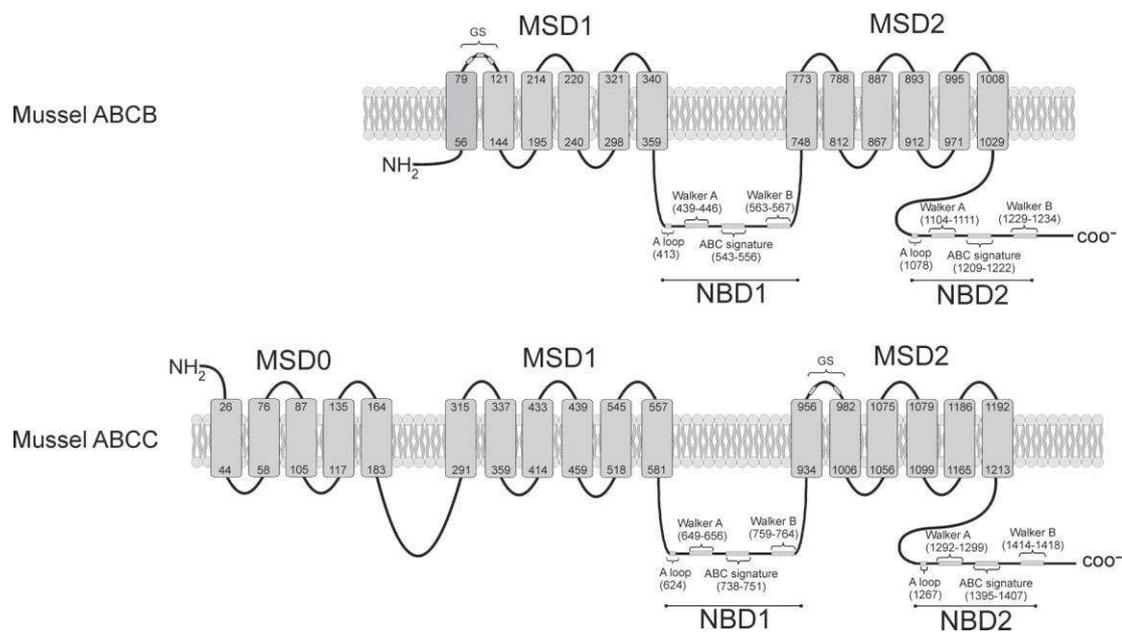
Classiquement, la mise en évidence du phénotype MXR peut se faire par deux approches distinctes. La première, très indirecte et largement utilisée, repose sur la détection des acteurs moléculaires du système ABC au niveau transcriptionnel ou protéique. Ainsi, on retrouve les techniques de d'immunodétection sur tissus ou par WesterBlot ou encore la recherche des transcrits par RT-PCR. Cependant, ces approches ne donnent aucune information fonctionnelle (Beck, Grogan *et al.*, 1996). Il est en particulier reconnu que les niveaux d'expression des transporteurs ABC ne sont pas corrélés à l'activité d'efflux, pour diverses raisons incluant le rôle des phosphorylations régulatrices et la compartimentation des territoires d'expression cellulaire (Lebedeva, Pande *et al.*, 2011). La seconde méthode, moins indirecte, se fonde sur l'activité d'efflux de certaines sondes allocrites fluorescentes, comme la calcéine (Legrand, Simonin *et al.*, 1998 ; Minier & Moore, 1998; Smital & Kurelec, 1998). Cette dernière méthode permet d'avoir une réponse fonctionnelle, intégrant différents niveaux de régulations. La méthode directe de mesure de la xénorésistance, à savoir les tests de survie cellulaire en présence de cytotoxiques, reste peu utilisée chez les invertébrés car les techniques de culture cellulaire sont rares pour ces organismes.

Dans ce manuscrit, nous référerons principalement au phénotype MXR chez les bivalves. Chez ces espèces, une grande partie des travaux a été réalisée à partir de tissus branchiaux (Bard, 2000).

Au début des années 1990, les travaux en biologie moléculaires ont permis d'identifier des transporteurs ABC chez les bivalves. Ainsi Minier *et al.*, en 1993, ont révélé la présence du gène MDR par hybridation de l'ADN génomique chez *Mytilus edulis* et *Crassostrea gigas*.

Ces résultats ont été confirmés par la suite notamment par PCR à partir d'ARN totaux extraits des branchies et du manteau de *Mytilus edulis* (Minier & Galgani, 1995) et des larves de *Crassostrea gigas* (Minier, Lelong *et al.*, 2002).

Un fragment du transcrite codant pour ABCB a été isolé en 2002 chez *Mytilus edulis* (Lüdeking & Köhler, 2002). En 2005, deux transcrits codant pour des MRP ont été identifiés chez cette même espèce (Ludeking, Van Noorden *et al.*, 2005). Trois ans plus tard chez *Mytilus californianus* Luckenbach *et al.* obtient les séquences complètes de deux transcrits (Luckenbach, Altenburger *et al.*, 2008). Après alignement avec des séquences de mammifères, il s'avère que l'un des ARNm s'apparente à un transcrite codant la P-gp et l'autre à un transcrite codant la MRP (**Figure 25**)



**Figure 25. Structure des transporteurs ABC chez *Mytilus californianus*.**  
D'après (Luckenbach & Epel, 2008)

Une induction de l'expression des transcrits ABCB/P-gp et ABCC/MRP a été montrée dans les branchies, le manteau et la glande digestive par RT-PCR après exposition au 2-acétylaminofluorene (Lüdeking & Köhler, 2002)

L'activité d'efflux propre au phénotype MXR a elle aussi été mise en évidence chez les bivalves, à partir de préparations d'organes isolés en survie. L'accumulation d'allocrites fluorescents (la rhodamine B ou la calcéine) ou radiomarqués ( $^3\text{H}$ -vincristine), a été testée après incubation avec des bloqueurs des références ou exposition à des composés organiques. Ainsi, en présence de vérapamil, les tissus branchiaux de *M. californianus* accumulent la

fluorescence (Cornwall, Toomey *et al.*, 1995; Eufemia & Epel, 2000). Des résultats similaires sont obtenus dans les branchies d'huitre *Crassostrea gigas* (Minier, Lelong *et al.*, 2002), de *M. galloprovincialis* (Galgani, Cornwall *et al.*, 1996), de *M. californianus* (Luckenbach & Epel, 2008), de *M. edulis* (Minier & Moore, 1998).

Au niveau des hémocytes peu d'études ont été réalisées et la plupart chez *M. edulis*. Les quelques études sont présentées dans le **Tableau 5**. Ces études sont pour la majorité des tests révélant l'activité d'efflux soit par l'utilisation de la Rhodamine B soit par la Calcein AM en présence d'inducteurs ou de bloqueurs connus pour avoir un effet chez les vertébrés. Seuls Minier et Moore en 1996 détectent la P-gp par Western Blot dans les hémocytes. Bien que des équipes observent la présence d'acteurs moléculaires et une activité d'efflux, Svensson et ses collaborateurs contredisent ces résultats.

	Technique		Remarques	Référence
<i>M. edulis</i>	WB	C219		Minier and Moore, 1996
	Efflux	Rhodamine B +/- VRP, vincriste		
	Efflux	<sup>3</sup> H-VCR et Rhodamine B +/- VRP	Les hémocytes n'expriment pas d'activité P-glycoprotein Contrôle sur des branchies	Svensson et al., 2003
	Efflux	C-AM +/- VRP, vincriste, vinblastin, atrazine	Dépendance à : osmolarité, température, anaérobiose	Luedeking and Koehler, 2004
	Efflux	C-AM +/- VRP, cyclosporine A, Doxorubicine, VCR	Dépendance à la température, Bloquage par le VRP et induction par la doxorubicine et la VCR	Marin et al, 2004

**Tableau 5. Principales études portant sur le phénotype MXR dans les hémocytes de *Mytilus edulis***

*WB*, Western Blot; *VRP*, verapamil; *VCR*, vincristine; *C-AM*, Calceine AM. +/- en presence ou absence

#### **D. Données concernant les régulations géniques des acteurs MDR/MXR**

Relativement bien documentés chez les Mammifères (Pasquier, 2011), les mécanismes moléculaires responsables de la régulation de l'expression des pompes d'efflux restent méconnus chez les bivalves. Quelques voies essentielles de régulation des phénotypes MDR/MXR sont détaillées dans les lignes qui suivent.

### **1. Expression génique constitutive**

Chez l'homme, le complexe de transcription de base, ARN polymérase et facteur de transcription généraux, suffit pour initier la transcription du gène *mdr1/ABCB1*. Cependant d'autres facteurs interviennent pour moduler l'efficacité avec laquelle le gène est exprimé. Ces facteurs interagissent directement avec les promoteurs du gène et/ou via des interactions protéine-protéine avec d'autres facteurs de transcription. La plupart de ces facteurs de transcription exercent un effet positif sur la transcription. D'une façon générale, le gène *mdr1/ABCB1* contient plusieurs promoteurs (Pasquier, 2011) dont : deux boîtes CCAAT qui interagissent avec le facteur de transcription NF-Y (Nuclear transcription Factor Y), des éléments GC qui lient le facteur de transcription SP1 (Specificity Protein 1), une boîte Y (boîte CCAAT inversée) capable de lier la protéine YB-1, un site AP-1 et enfin un site HSE (Heat Shock Element). Quant aux gènes *mrp/ABCC*, leurs promoteurs semblent constitués d'éléments GC, ainsi que des boîtes CCAAT liant respectivement SP1 et NF-Y. De façon intéressante, tous les transporteurs liés au transport de xénobiotiques chez l'Homme révèlent l'absence d'une boîte TATA fonctionnelle alors que chez les rongeurs, la transcription est TATA box dépendante (Scotto, 2003).

### **2. Surexpression génique**

A ce jour, trois mécanismes de surexpression du gène *mdr1/ABCB1* ont pu être identifiés. Ces surexpressions sont observées dans les cellules cancéreuses chimiorésistantes. Le premier mécanisme décrit repose sur l'activation d'un site additionnel d'initialisation connue sous le nom de MED-1 (Multiple start site Element DownStream) (Ince & Scotto, 1995) ou de iMED (séquence inversée de MED)(Scotto, 2003). Il semble que MED-1 interagisse avec un complexe de chromatine. D'autres transporteurs ABC comme les MRP utiliseraient MED-1 également dans leur régulation (Scotto, 2003).

Le second mécanisme repose sur une protéine nommée MEF-1 (*MDR-1 promoter-Enhancing Factor 1*). Cette protéine active directement la transcription du gène *mdr1/ABCB1*, via une boîte CCAAT.

Enfin, le réarrangement de gène constitue le dernier mécanisme de surexpression génique. Plusieurs cas de translocation ont été rapportés faisant passer le gène *mdr1/ABCB1* sous contrôle d'autres promoteurs. C'est le cas d'une lignée cellulaire d'adénocarcinome de côlon, des MCF-7 et de tumeurs prélevées sur des patients (Mickley, Spengler *et al.*, 1997; Knutsen, Mickley *et al.*, 1998). De plus, des mutations dans les séquences promotrices

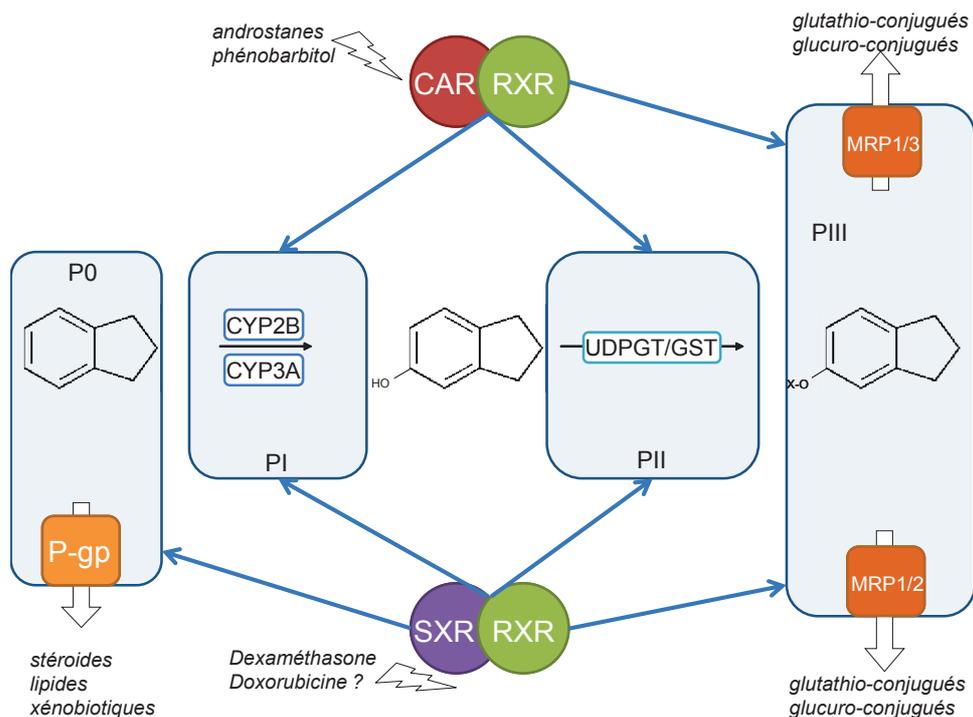
peuvent altérer la transcription (Stein, Walther *et al.*, 1994), ce qui peut avoir une pertinence dans le contexte clinique (Fromm, 2002).

### 3. Expression génique induite

Plusieurs conditions sont rapportées pour induire une expression des transporteurs ABC impliqués dans l'efflux des xénotoxiques. L'exposition des cellules à des rayonnements UV augmente la transcription du gène codant pour la P-gp (Scotto & Egan, 1998). De même que le choc thermique via le facteur de transcription HSF, ou encore l'hypoxie (Scotto, 2003). En condition de normoxie le facteur HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1) réside dans le cytoplasme. Il est transloqué dans le noyau en condition hypoxique où il est capable d'activer le promoteur du gène *mdr1/ABCB1*.

L'inflammation peut, elle aussi, induire une expression du gène *mdr1/ABCB1* via NF-IL6 et NFκB (Nakatsukasa, Silverman *et al.*, 1993; Zhou & Kuo, 1997).

Dans les années 90, d'importants efforts ont été réalisés pour identifier les voies d'induction des enzymes de détoxification cellulaire et de métabolisation des xénobiotiques. Ces travaux ont permis, via des séquençages et des études de liaison, de découvrir chez les vertébrés plus de 150 protéines correspondant à des récepteurs nucléaires. Parmi ces récepteurs, seulement 15 étaient connus pour posséder au moins un ligand endogène identifié, principalement des hormones lipophiles (Mangelsdorf & Evans, 1995). Les autres récepteurs étaient alors considérés comme orphelins. Le *Retinoid X Receptor*, RXR est rapidement apparu comme essentiel, formant des hétérodimères (Mangelsdorf, Thummel *et al.*, 1995; Callaghan, Crowley *et al.*, 2008) avec d'autres récepteurs orphelins comme : le LXR (*Liver X Receptor*), le FXR (*Farnesoid X receptor*), le PPAR (*Peroxisomal Proliferator Activated Receptor*), le CAR (*Constitutive Androstane Receptor*), et le SXR (*Steroid and Xenobiotic Receptor*, aussi connu sous le nom de PXR, *Pregnane X Receptor*). Les deux derniers récepteurs cités ici, CAR et SXR/PXR sont maintenant considérés comme des senseurs chimiques à large spectre, sensibles à de nombreux métabolites endogènes et composés xénobiotiques. Comme l'illustre la **Figure 26**, les hétérodimères CAR/RXR et SXR/RXR fixent des ligands endo- ou xénobiotiques et induisent fortement les acteurs des Phase I/II et 0/III, De façon spécifique, CAR/RXR induit exclusivement la classe MRP/ABCC tandis que le couple SXR/RXR induit exclusivement les transporteurs MDR1/ABCB1 (Synold, Dussault *et al.*, 2001; Miki, Suzuki *et al.*, 2005; Timsit & Negishi, 2007; Callaghan, Crowley *et al.*, 2008).



**Figure 26. Induction des acteurs de détoxification cellulaire par les récepteurs nucléaires partenaires de RXR**

*D'après (Callaghan, Crowley et al., 2008)*

Les hétérodimères incluant RXR comme partenaire forment donc une famille aux ligands multiples qui semble intervenir dans la résistance pleiotrope en constituant une voie de transduction unique des acteurs de la détoxification cellulaire (Callaghan, Crowley *et al.*, 2008; di Masi, Marinis *et al.*, 2009).

## E. Régulations du phénotype MXR chez les bivalves

### 1. Physiologiques directes

Chez les Mammifères, l'activité de la P-glycoprotéine est régulée par phosphorylation (Stolarczyk, Reiling *et al.*, 2011). Les inhibiteurs spécifiques de la PKC, comme le bisindolylmaléimide ou la staurosporine, inhibent l'activité d'efflux chez *M. galloprovincialis* (Kurelec, 1995b) et chez *Corbicula fluminea* (Kurelec, Waldmann *et al.*, 1996). Cette inhibition se manifeste par une accumulation accrue de <sup>3</sup>H-vincristine, dans les branchies des moules exposées à l'inhibiteur de PKC par rapport aux contrôles. Il a aussi été montré une dépendance du phénotype MXR à l'ATP (Kurelec & Pivčević, 1991). Cette dépendance énergétique a été utilisée pour évaluer l'activité MXR de façon indirecte (Parant & Pain, 2001).

## 2. Chimiques

Dans leurs travaux pionniers, Kurelec *et al.* ont proposé l'existence d'une activité constitutive, chez toutes les espèces, y compris celles vivant dans un environnement de bonne qualité (Kurelec, 1992; Kurelec, 1995a). Cependant, cette activité basale présente une variabilité intraspécifique et interspécifique. De surcroît, les niveaux d'activité ou d'expression mesurés sont plus élevés chez les individus exposés à des contaminants (Kurelec & Pivčević, 1991; Minier, Akcha *et al.*, 1993; Kurelec, 1995a; Smital & Kurelec, 1998). L'étude comparative de six espèces de mollusques aquatiques montre des niveaux d'activité différents. Les espèces les plus résistantes comme *D. polymorpha*, *Viviparus viviparus* et *M. galloprovincialis* présentent une forte activité alors que les plus pollusensibles comme *Monodonta turbinata*, *Paludina lusitanica* ou *A. cygnea* expriment une plus faible activité (Smital, Sauerborn *et al.*, 2000).

Bien qu'il existe apparemment des différences de niveau basal au sein d'une même espèce, l'induction du phénotype reste tout à fait possible notamment lorsque les individus proviennent de sites faiblement impactés. Chez de jeunes moules *M. galloprovincialis* l'hydrocarbure diesel-2 inhibe de manière compétitive l'efflux des xénobiotiques. Dans ce cas précis, il augmente l'accumulation de l'allocrite <sup>3</sup>H-Vincristine dans les cellules (Kurelec, 1995a). De même, Marin *et al.*, en 2004, montrent dans leurs travaux que l'activité d'efflux peut être induite, chez *M. edulis*, après exposition à la doxorubine ou à la vincristine. Cette même activité est bloquée par le véramapil. Dans des explants de tissus branchiaux de *M. edulis*, la quantité de transcrits codant pour l'ABCB/P-gp like augmente d'un facteur 3 lors d'une exposition de 24 h à 2.5 ng ml<sup>-1</sup> de 2-acétylaminofluorene (2-AAF) (Lüdeking & Köhler, 2002). Un doublement du niveau des transcrits ABCC/ MRP est observé par les mêmes auteurs à la suite d'une incubation de 200 µM de 2-AAF pendant 96 h (Ludeking, Van Noorden *et al.*, 2005).

Bien que des travaux montrent des corrélations entre le niveau d'activité ou d'expression du phénotype MXR avec le niveau de contamination du milieu (Minier, Akcha *et al.*, 1993), il semble que pour des animaux prélevés dans des eaux contaminées, l'induction soit faible voire inexistante (Kurelec, Krča *et al.*, 1996; Bresler, Bissinger *et al.*, 1999).

L'existence du récepteur nucléaire RXR chez les mollusques (Bouton, Escriva *et al.*, 2005) et plus précisément chez les bivalves comme *Mytilus* (Raingeard, Bilbao *et al.*, 2013) permet d'envisager une induction génique via les hétérodimères à base de RXR.

### 3. Saisonnères

Chez les bivalves, comme chez de nombreuses espèces vivantes, l'alternance des saisons influence les activités biologiques. Ainsi les facteurs abiotiques, comme la température, ou biotiques, comme la disponibilité en nourriture ou la reproduction, induisent des variations physiologiques (Santarem, Robledo *et al.*, 1994; Carballal, Villalba *et al.*, 1998; Gosling, 2003). Il en va de même pour le phénotype MXR. Le suivi annuel chez *Mytilus galloprovincialis* (Minier, Borghi *et al.*, 2000), *Crassostrea virginica* (Keppler & Ringwood, 2001) ou *Dressena polymorpha* (Pain, 2003) révèle une variation saisonnière. Ainsi une hausse d'expression ou d'activité MXR est observée chez ces 3 espèces avec l'élévation de la température de l'eau en été et automne. Le suivi concomitant de la protéine de choc thermique HSP 70, par Minier *et al.* montre le même profil d'expression. En outre, l'induction de protéines MXR a été obtenue expérimentalement chez *M. galloprovincialis* par chocs thermiques (Eufemia & Epel, 2000) et est déjà connue chez l'homme (Chin, Tanaka *et al.*, 1990; Vilaboa, Galán *et al.*, 2000). Le choc thermique ou la prolifération algale peuvent être responsables de l'expression saisonnière de la P-gp (Bard, 2000). De même, les données collectées par (Eufemia, Clerte *et al.*, 2002) indiquent que les algues marines contiennent des composés qui sont des substrats de la P-gp et/ou des chimiosensibilisants pour des bivalves marins. Peut-être sont-ils également inducteurs.

Cependant, il convient de distinguer les effets directs dus aux variations saisonnières de température des effets indirects associés aux fluctuations des concentrations en xénobiotiques allocrites, inhibiteurs ou inducteurs. En effet, et pour ne prendre que quelques exemples, les rejets industriels, les facteurs de dilution (précipitations, crues), la turbidité (charge en sédiments, micro-organismes), l'oxygène dissous, sont autant de paramètres altérant la biodisponibilité des xénobiotiques. (Sheehan & Power, 1999). Ainsi, les variations saisonnières des niveaux de transcrit ou d'activité ABC peuvent révéler à la fois une régulation thermique de l'activité enzymatique, une régulation physiologique du niveau de phosphorylation ou de la voie de l'hypoxie médiée par HIF-1 ou une induction chimique par des hétérodimères nucléaires SXR/RXR.

# ***OBJECTIFS DE LA THESE***

---

Les données bibliographiques exposées précédemment montrent que l'immunité exclusivement innée des *Mytilidae* repose essentiellement sur l'activité des hémocytes qui, au moyen d'un ensemble complexe de mécanismes de défense en interaction, maintiennent ces organismes en bonne santé.

Des approches multiparamétriques, incorporant un plus ou moins grand nombre d'éléments (pour exemples (Auffret, Rousseau *et al.*, 2006; Akaishi, St-Jean *et al.*, 2007)), sont proposées afin d'estimer le niveau d'immunocompétence et les éventuelles atteintes immunotoxiques pouvant altérer les capacités de défense des individus en présence de contaminants chimiques ou microbiens. L'interprétation des résultats obtenus nécessite une compréhension approfondie des acteurs cellulaires et moléculaires de l'immunité de *Mytilus sp.*

Bien que les hémocytes de moule ne forment manifestement pas une population homogène, aucun marqueur moléculaire ne permet actuellement de distinguer différents types de cellules. Les expériences visant à comparer les activités hémocytaires dans différentes situations, animaux témoins *versus* animaux exposés par exemple, analysent donc les réponses hémocytaires comme un tout, sans discriminer les sous-types cellulaires. Dans ce contexte, ce travail de thèse a été orienté sur deux axes principaux.

Le premier axe vise à proposer une meilleure caractérisation des populations et des activités hémocytaires. Un effort particulier a été mené pour inclure la dynamique morphologique et motilité des immunocytes parmi les paramètres mesurés.

Le second axe de recherche est la caractérisation de l'activité des transporteurs de type ABCB/P-gp et de type ABCC/MRP au sein des sous-populations d'hémocytes.

Ces deux axes s'appuient sur trois développements méthodologiques importants. Il s'agit tout d'abord de pouvoir développer des tests reproductibles à partir d'hémocytes maintenus en culture primaire pendant plusieurs jours. Une nouvelle approche quantitative de mesure de la motilité est proposée à partir d'une trajectographie obtenue sur des noyaux marqués au Hoechst 33342 et de séquences enregistrées en épifluorescence à l'aide d'un intervallo-mètre numérique. Cette technique offre, en outre, la possibilité de suivre l'activité et la survie des cellules en culture. Finalement, la mesure du volume cellulaire vrai, dit

"electronique", par effet Coulter, est mise à profit afin de déterminer des activités d'efflux normalisées par le volume, exprimées en concentration de fluorescence.

### ***Présentation des résultats***

Les résultats scientifiques sont présentés sous forme d'articles précédés d'un résumé en Français et d'un tableau de synthèse utilisant le modèle **DiPHTeRIC** (Cariou, 2002).

Cet outil propose une approche plus élaborée de la méthode scientifique hypothético-déductive, présentée par le grand physiologiste Claude Bernard (1813-1878), dans son ouvrage *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale*.

Dans la démarche DiPHTeRIC,

**Di** représente les Données initiales (Littérature scientifique, représentations),

**P** correspond au problème à résoudre (le questionnement),

**H** indique les hypothèses formulées à l'initiale du travail,

**Te** présente les tests mis en œuvre (expériences),

**R** regroupe les résultats à analyser,

**I** représente les interprétations proposées, et

**C** les conclusions tirées de la démarche entreprise.

Le modèle DiPHTeRIC est ici complété par une rubrique **NP**, nouveau problème, listant un certain nombre de questions –nouvelles ou non- qui sont soulevées par les résultats obtenus dans l'article y afférent.

# ***MATERIELS ET METHODES***

---

## ***Chapitre 1. Mytilus edulis***

### ***I. Généralités sur les mollusques et les bivalves***

Avec plus de 100 000 espèces, le phylum des mollusques est le deuxième embranchement en termes de nombre d'espèces connues, après celui des arthropodes. La diversité au sein de ce clade se manifeste par une grande variété de tailles, d'organisations anatomiques, d'habitats ou encore de modes d'alimentation. Les mollusques ont colonisé tous les milieux. Bien que de nombreuses espèces soient terrestres ou dulcicoles, la plupart des individus représentent des espèces marines. En milieu marin, les mollusques sont des espèces aussi bien pélagiques que benthiques réparties tout au long du continuum zone littorale, zone hadale, zone continentale. Au total, les zoologistes ont consacré sept classes de la taxonomie au phylum des mollusques. Parmi elles, trois sont considérées comme majeures : la classe des gastéropodes (environ 80 000 espèces), celle des bivalves (environ 20 000 espèces) et celle des céphalopodes (près de 700 espèces). Parmi tous les mollusques, c'est dans ces trois classes que l'on retrouve les espèces à grand intérêt économique pour les secteurs de la gastronomie et de la joaillerie mais aussi pour les applications dans le domaine médical et cosmétique.

La systématique classique décompose actuellement les bivalves en plusieurs sous-classes, dont une nous intéresse plus particulièrement : les ptériomorphes. Dans cette sous-classe, les branchies sont complexes, constituées d'une série de longs filaments parallèles pliés en forme de « W ». Elles jouent un rôle dans l'oxygénation des tissus, mais aussi dans la ventilation et la prise alimentaire grâce à leur ciliature. Le pied de ces animaux est réduit et le bord de manteau n'est pas fusionné en partie ventrale formant ainsi 2 lobes. Le plus souvent ce sont des espèces épibenthiques, parfois fixées au substrat par du byssus. Les ptériomorphes incluent cinq ordres différents parmi lesquels on trouve l'ordre des Ostreoidés : les huîtres, l'ordre des Pectinidés : coquilles Saint Jacques et pétoncles, et l'ordre des Mytiloidés : les moules.

## II. Le genre *Mytilus*

Les représentants les plus connus de cet ordre font partie du genre *Mytilus*, dont deux espèces sont majoritairement cultivées en production conchyicole et bien connues scientifiquement: *M. edulis* (la moule bleue : Pubmed propose 1625 articles sur cette espèce en septembre 2013) sur les côtes bretonnes, dans tout le nord de l'Europe, ainsi qu'au Canada, et *M. galloprovincialis* (1133 résultats sur Pubmed à la même date) sur les côtes méditerranéennes, espagnoles, portugaises et atlantiques. En tant qu'animaux filtreurs, les mollusques bivalves sont considérés comme d'excellents bio-indicateurs de contamination des eaux marines et continentales. Les premières utilisations de mytilidés pour étudier les niveaux et les évolutions des contaminations chimiques dans le milieu aquatique datent du milieu des années 1970 (Goldberg, 1975). Leur forte capacité de bioaccumulation a d'abord été mise en évidence pour les métaux bivalents, puis pour les substances chimiques organiques comme par exemple les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Baumard, Budzinski *et al.*, 1999). Les moules ont été utilisées avec succès pour la surveillance de la contamination des milieux côtiers en polluants organiques et des programmes de surveillance : pour exemple Mussel Watch (Kimbrough, 2008) aux Etats Unis depuis 1986 ou encore le Réseau d'Observation de la Contamination CHimique du littoral ; ROCCH, (Aquaculture, 2011). Récemment, l'étude de la bioaccumulation s'est étendue aux perturbateurs endocriniens (Janer, Lavado *et al.*, 2005), aux pesticides (Berny, Lachaux *et al.*, 2002), aux médicaments (Le Bris & Pouliquen, 2004) et autres contaminants émergents comme les nanoparticules (Canesi, Ciacci *et al.*, 2012).

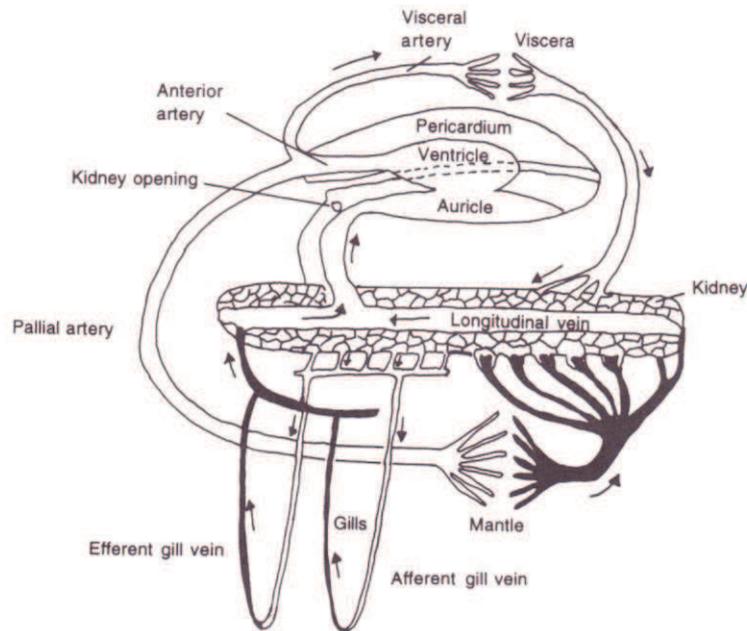
Ainsi, ces organismes marins présentent un intérêt important en toxicologie de l'environnement, mais l'intérêt le plus connu reste la mytiliculture pour la consommation avec en 2010 une production mondiale de plus de 200 000 tonnes (Fisheries and Aquaculture Department, 2012) pour *M. edulis* et 1,8 millions de tonnes tous Mytilidés confondus (*M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. chilensis*, *M. coruscus*, *P. veridis*, *P. canaliculus*) (Aquaculture, 2012)

Cependant, l'industrie conchyliicole connaît des épisodes de difficultés. Des phénomènes de mortalité estivale sont régulièrement rapportés chez de nombreuses espèces, notamment chez les huitres, *Crassostrea gigas*. Chez *Mytilus* moins de cas sont rapportés. Ils sont le plus souvent multifactoriels. Les épisodes de mortalité peuvent être attribués à la conjonction de conditions environnementales défavorables résultant des activités anthropiques et/ou des changements des conditions environnementales naturelles. Par exemple, des

températures de l'eau plus élevées que la normale, des niveaux de salinité variables, de faibles teneurs en oxygène dissous, des pollutions chimiques et la présence de microorganismes pathogènes, y compris des bactéries et des algues toxiques, comptent parmi ces conditions de stress capables d'altérer la physiologie et notamment les défenses immunitaires des mollusques. Plus particulièrement, la présence de pathogènes a souvent été rapportée dans des cas de mortalités estivales. En France, *Vibrio splendidus* a été associé avec les mortalités de juvéniles d'huîtres *Crassostrea gigas* (Lacoste, Jalabert *et al.*, 2001) et les épisodes d'élévation de température lors des périodes estivales ont été corrélés avec la mortalité et la diminution de croissance chez *Mytilus edulis* (Robert, Le Moine *et al.*, 2003; Robert, Soletchnik *et al.*, 2007).

### **III. Le système hémolympatique**

Comme tous les bivalves, la moule bleue possède un système circulatoire ouvert, le système hémolympatique qui comprend un cœur composé d'un ventricule et de deux oreillettes (**Figure 27**). Ce cœur est situé au centre de la partie dorsale, proche de la charnière coquillière. La circulation hémolympatique s'effectue à partir du ventricule qui propulse l'hémolymphe dans les aortes antérieures et postérieures, puis dans les artères et enfin dans les artérioles. Ainsi, l'hémolymphe, pompée par le cœur, se déverse dans un espace liquide ouvert, l'hémocoèle et baigne par conséquent directement les tissus. Le réseau vasculaire, qualifié de diffus, est constitué de ramifications, de lacunes ou sinus à parois fines qui permettent le retour de l'hémolymphe vers ce dernier. L'hémolymphe assure de nombreuses fonctions physiologiques comme les échanges des gaz dissous, l'osmorégulation, la distribution des nutriments et élimination des déchets. Elle joue aussi le rôle de fluide squelettique, assurant la rigidité de certains organes comme les palpes labiaux, le pied ou encore le bord de manteau. L'hémolymphe véhicule plusieurs types cellulaires, les hémocytes, qui ont un rôle important dans le système immunitaire des moules, assurant entre autre la phagocytose. De façon intéressante il peut être relevé que les céphalopodes sont les seuls animaux non vertébrés possédant un système circulatoire clos endigué par un épithélium, ce qui place les mollusques en point central de l'évolution vers le système vasculaire clos des vertébrés.



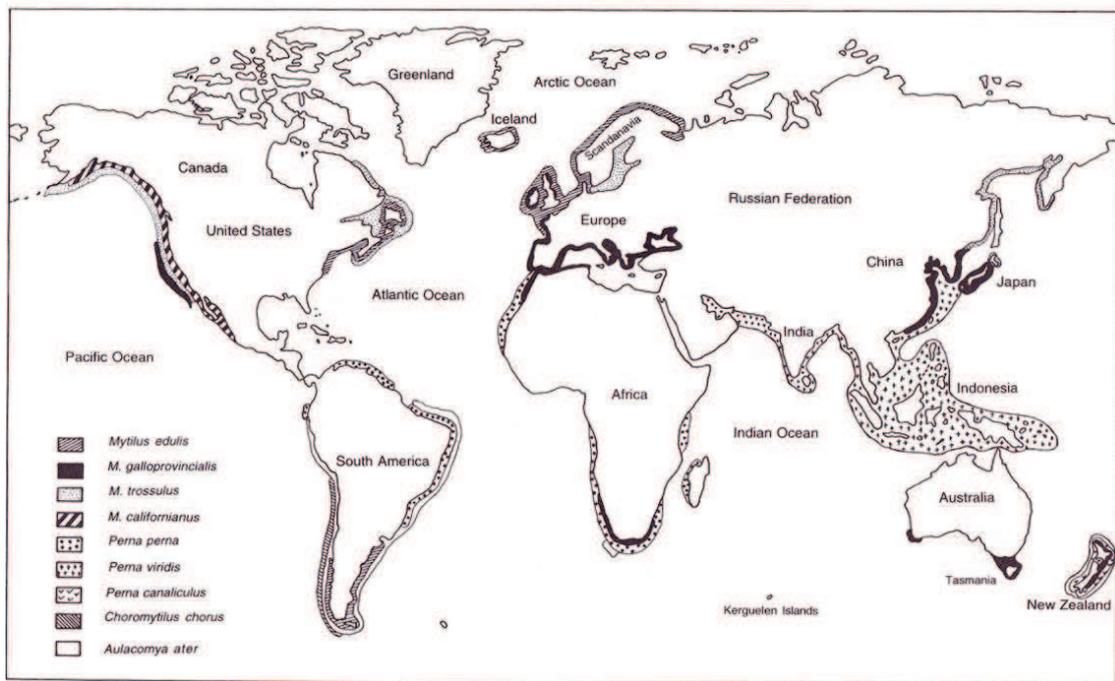
**Figure 27. Système circulatoire de la moule bleue *Mytilus edulis*.**

Chez les bivalves, l'hémolymphe circule du cœur vers les organes avant d'être collecté par la veine longitudinale. C'est un système circulatoire semi-ouvert, notamment au niveau du manteau et des viscères. Redessiné d'après Borradaile et al. (1961), (Gosling, 2003)

#### ***IV. Répartition géographique, habitat et écophysiologie***

*Mytilus edulis* présente une large répartition géographique. En effet, le spectre d'habitat de ce mollusque s'étend de la côte est de l'Amérique du Nord (USA et Canada), vers le sud du Groenland et de l'Islande puis, jusqu'aux côtes ouest de l'Europe (Venier, Pallavicini *et al.*, 2003). En Europe, la moule bleue peuple aussi bien les zones nordiques de la Scandinavie que les écosystèmes tempérés dont le Bassin d'Arcachon constitue la limite méridionale (**Figure 28**). Ainsi, on estime que *Mytilus edulis* est largement distribuée dans la zone boréale-tempérée jusque dans les régions subarctiques (Newell, 1989). Ces animaux ont la capacité de supporter de larges fluctuations de salinité, de dessiccation, de température et de teneur en oxygène, ce qui fait qu'ils occupent une grande variété de micro habitats, des régions intertidales les plus élevées aux régions subtidales, ainsi que des estuaires paraliques aux eaux de mer entièrement océaniques. Ainsi, tolérantes à un large éventail de conditions environnementales, la moule bleue est une espèce euryhaline, qui se retrouve aussi bien dans les eaux marines (34 ppt) que saumâtres (5 à 18 ppt), et eurythermes, pouvant supporter des conditions glaciales pendant plusieurs mois, mais aussi des températures élevées pour des organismes marins (la température létale est estimée à 29°C environ en immersion (Bayne,

1976)). Son optimum thermique est compris entre 10 et 20°C. Les animaux vivant au niveau de l'estran doivent faire preuve de remarquables processus de résistance notamment aux stress anoxiques/hyperoxiques, mécaniques et thermiques puisqu'ils doivent être capables d'endurer, à marée basse, plusieurs heures sans apport d'oxygène tout en étant exposés aux températures élevées estivales (ou faibles hivernales) avant de recouvrer brutalement les conditions aquatiques locales à marée montante.



**Figure 28. Répartition géographique de plusieurs espèces de bivalves.**  
*D'après (Gosling, 2003)*



## *Chapitre 2. La cytométrie en flux*

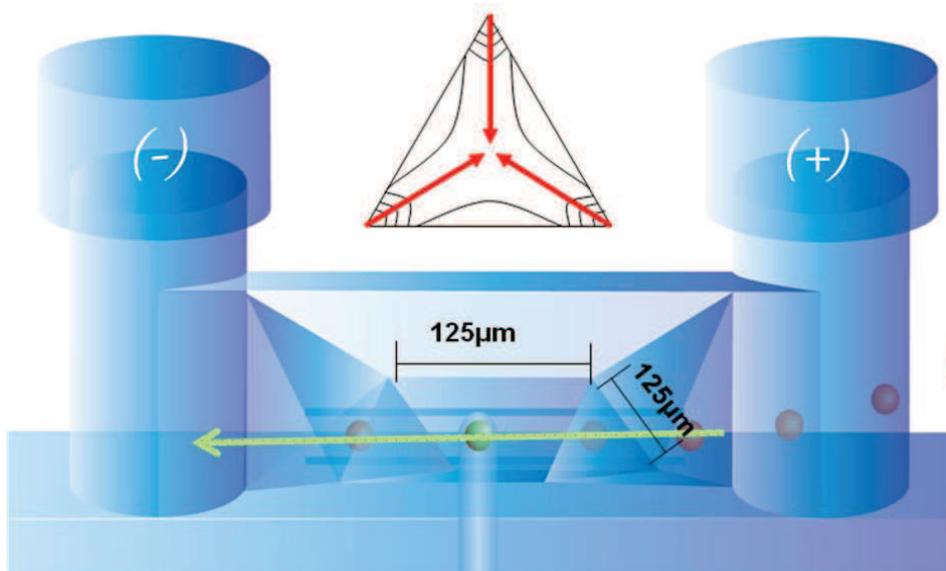
Le Cell Lab Quanta SC-MPL est un cytomètre de dernière génération de la société Beckman-Coulter, plus particulièrement dédié à la recherche scientifique. Cet appareil, très polyvalent, permet de quantifier différents paramètres sur des particules de petite taille ( $<100\ \mu\text{m}$ ), prises isolément dans un échantillon liquide. Ces paramètres sont : le volume électronique selon le principe Coulter, la complexité via la diffraction de côté (side-scatter) et la fluorescence (autofluorescence des particules ou fluorescence induite après immunomarquage ou incubation avec des sondes moléculaires). Dans le cas général de préparations cellulaires, la condition préalable à l'analyse est l'obtention d'une solution monodispersée de cellules fixées ou vivantes.

### *I. La fluidique*

Sur le Cell Lab Quanta, le prélèvement s'effectue par aspiration grâce à une seringue calibrée. Cette technologie permet de connaître le volume exact prélevé et donc de donner la concentration vraie des particules dans l'échantillon, contrairement aux cytomètres concurrents qui chargent l'échantillon par pression positive. Le volume prélevé (sample-size) peut être configuré par l'expérimentateur et varier de 25 à 300  $\mu\text{L}$ .

La puissance de la cytométrie réside dans sa capacité à analyser individuellement un très grand nombre de cellules et à accéder à la dimension populationnelle. Les cellules doivent défiler les unes derrière les autres dans la chambre d'analyse. Pour ce faire, la cytométrie utilise un principe de mécanique des fluides appelé hydrofocalisation. La suspension cellulaire est amenée au centre d'une buse dans laquelle un liquide de gaine (sheath) est aspiré plus ou moins fortement conditionnant alors la vitesse de défilement de l'échantillon. Cette vitesse peut être réglée par l'utilisateur via le logiciel de pilotage, de 4,17  $\mu\text{L}/\text{min}$  à 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  sur le Cell Lab Quanta Collection. L'architecture de la chambre d'analyse (flow cell), un prisme équilatéral de 125  $\mu\text{m}$  de côté dans le cas particulier du Cell Lab Quanta, permet la création d'un flux laminaire (**Figure 29**). En effet, la sortie réduite crée une accélération du liquide de gaine qui entraîne en son sein une veine d'échantillons. Le flux

ainsi créé permet de transporter les cellules une à une, correctement individualisées devant la source d'illumination.



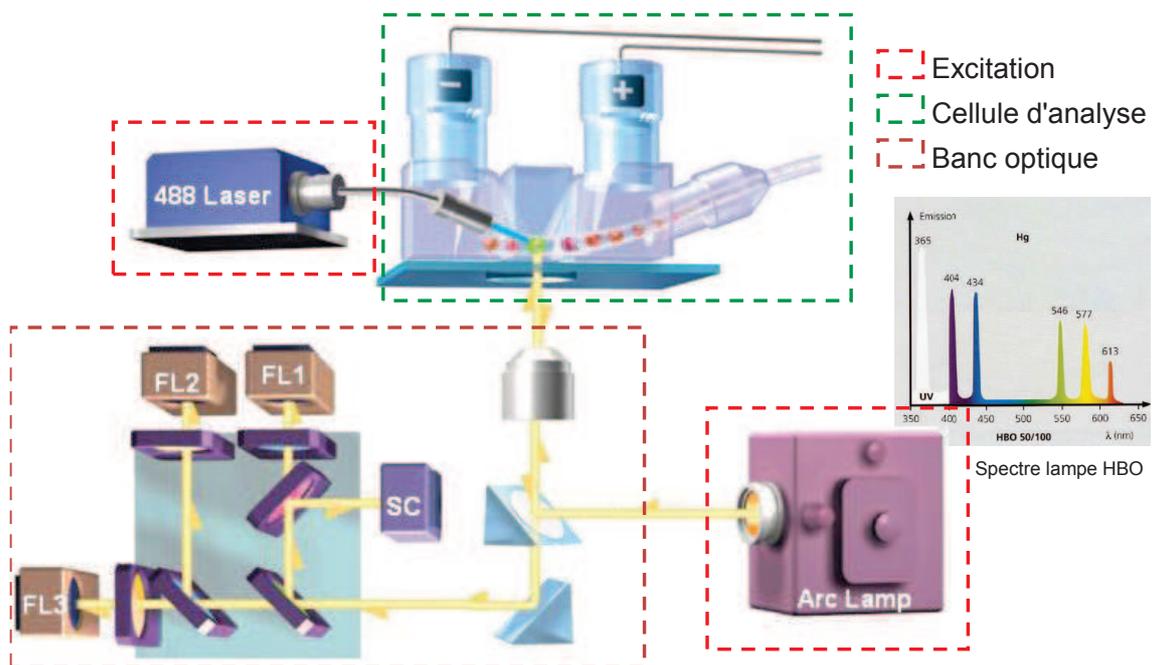
**Figure 29. Schéma de la Flow-Cell du Cell Lab Quanta et des forces mises en jeu.**  
*La Flow-Cell est un prisme équilatéral de 125 µm bordé par l'anode et la cathode du système Coulter. L'architecture en prisme de la Flow-Cell permet de centrer les particules comme le montre le schéma. Les forces mises en jeu sont indiquées par des flèches rouges. La flèche verte représente le trajet des cellules.*

La composition du liquide de gaine conditionne le comportement de l'échantillon : afin d'obtenir des résultats précis, il faut veiller à utiliser un liquide de gaine présentant une densité inférieure ou égale à celui de l'échantillon, l'idéal étant un liquide de gaine de même densité que l'échantillon pour éviter les phénomènes de réflexion. Théoriquement, il n'y a pas d'échanges entre le liquide de gaine, qui reste périphérique, et l'échantillon liquide, central. Il est donc tout à fait possible, en théorie, d'utiliser de l'eau distillée. La plupart des cytomètres actuellement sur le marché utilisent un système de pressurisation pour faire circuler les échantillons. Le Cell Lab Quanta SC-MPL utilise une pompe à vide créant une dépression et ainsi une aspiration des échantillons permettant de connaître directement le volume exact prélevé et ainsi une concentration, contrairement aux autres machines, qui elles, doivent être calibrées.

## II. L'illumination et l'optique.

L'analyse des cellules est rendue possible par le biais d'une source lumineuse qui permet d'exciter les marqueurs fluorescents d'une part, et d'analyser la diffraction de côté, d'autre part. Sur le Cell Lab Quanta, la diffraction dans l'axe n'est pas utilisée car le volume cellulaire est obtenu par un appareil de Coulter.

Le Cell Lab Quanta SC-MPL est doté d'une diode laser fournissant une raie d'excitation à 488 nm. Sa puissance peut varier entre 0mW et 22mW et est directement réglée par l'utilisateur via le logiciel. La quantité de fluorescence émise par les fluorochromes est proportionnelle à l'intensité de l'excitation. La puissance du laser influe donc sur la sensibilité de détection de l'appareil. Il existe d'autres paramètres faisant varier la sensibilité telle que la forme, la taille ou le profil énergétique (TEM, Transverse electromagnetic mode) du point d'illumination. Le Cell Lab Quanta SC-MPL utilise le mode TEM<sub>00</sub>. La lumière monochromatique du laser est acheminée via une fibre optique jusqu'à la flow cell où elle pourra illuminer les cellules circulantes.

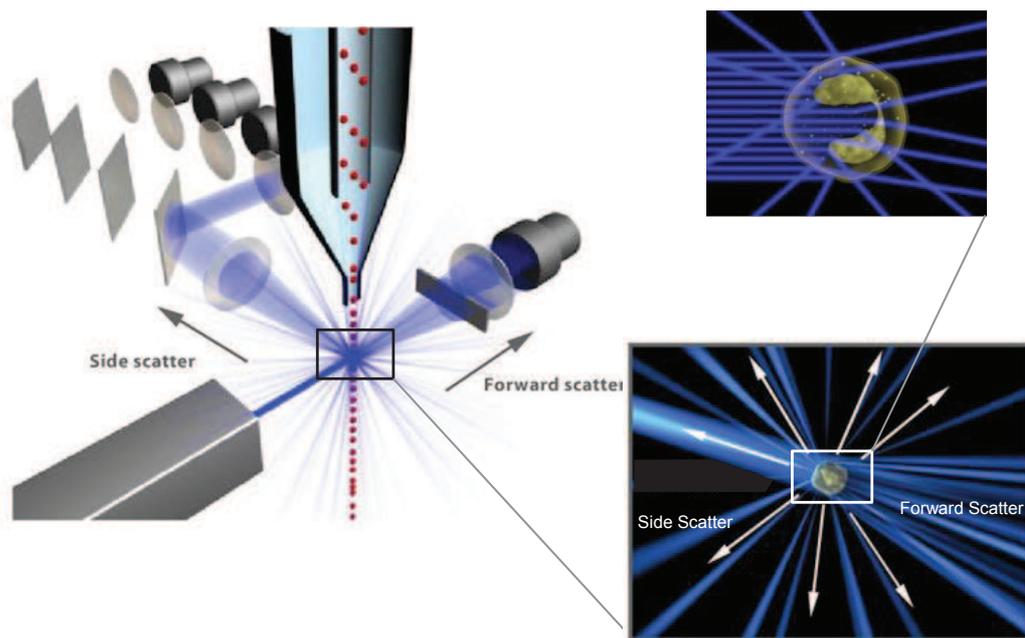


**Figure 30. Trajets optiques du Cell Lab Qanta.**

Le Cell Lab Quanta possède deux sources d'illumination différentes, une lampe HBO (366 nm) et un laser (488 nm) en pointillé rouge. La lumière émise de la lampe HBO passe par un miroir dichroïque avant d'être transmise à la Flow-Cell (pointiller vert) par l'objectif (Epifluorescence). La configuration du banc optique (pointiller brun) permet de récupérer les signaux lumineux correspondant aux fluorochromes utilisés. (d'après l'illustration du Cell Lab Quanta, Beckmann Coulter)

En plus du laser 488 nm, notre cytomètre utilise une 2ème source d'excitation : une lampe à vapeur de mercure (Lampe HBO) montée derrière un filtre 355/37 nm. Cette dernière permet l'excitation dans l'UV grâce à la raie 365 nm. L'illumination de la lampe à vapeur de mercure chemine par le micro-objectif (principe de l'épifluorescence) (**Figure 30**).

Les cellules circulant dans la veine liquide sont frappées par la source d'illumination, lampe HBO et/ou laser. Elles émettent alors une fluorescence qui doit être acheminée vers des photomultiplicateurs. Le premier signal collecté est la diffusion aux grands angles, appelée aussi side-scatter (SS), de la raie laser à 488 nm. Ce signal, récupéré à 120° par rapport aux faisceaux lumineux, est un mélange de diffusion, de réflexion et de réfraction. Cela donne une indication sur la structure interne des cellules, tels que la granulométrie et le rapport nucléocytoplasmique (**Figure 31**). Le signal du side-scatter est fonction de la complexité cellulaire. Ce paramètre est très souvent utilisé pour discriminer les différentes sous populations cellulaires dans le sang. Dans notre cas, avec l'hémolymphe, le side-scatter nous permettra de discriminer plusieurs sous populations.

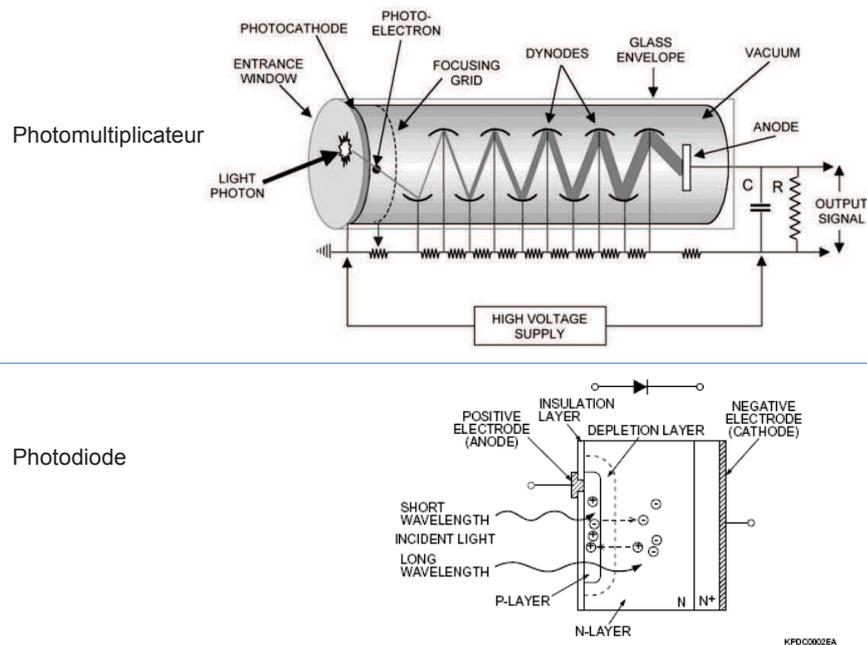


**Figure 31. Principe de mesure de la complexité cellulaire**

*Lorsqu'une particule passe devant le rayon laser, celui-ci est diffracté. Plus la particule se révèle hétérogène, plus la diffraction est importante. La complexité relative est mesurée par la diffraction aux grands angles, appelée aussi side scatter ou SSC. Dans le Cell Lab Quanta, le signal est récupéré par une photodiode. (Illustration d'après le Clinical Science Centre, [http://flow.csc.mrc.ac.uk/?page\\_id=852](http://flow.csc.mrc.ac.uk/?page_id=852))*

La totalité de la lumière émise correspond à la fluorescence des cellules, naturelle en situation d'autofluorescence, ou fonction de la quantité de sonde accumulée lors d'un marquage par un ou plusieurs fluorochromes spécifiques de compartiments cellulaires,

d'activités enzymatiques ou de protéines. Le système optique collectant les signaux consiste en un micro-objectif x100 à immersion à huile avec une ouverture numérique de 1,25. Les signaux alors collectés sont dirigés vers les photomultiplicateurs grâce au banc optique. Le banc optique est composé de miroirs dichroïques et de filtres permettant de diriger les longueurs d'onde de la lumière collectée vers les détecteurs appropriés. Ce système de banc optique permet de récupérer plusieurs fluorescences afin de faire des analyses multiparamétriques. Sur le Cell Lab Quanta ce dernier est totalement modulable et permet ainsi d'utiliser simultanément les deux sources d'illumination, laser 488 et lampe HBO, et les trois longueurs d'ondes de détection (FL1, FL2 et FL3) (**Figure 30**) ce qui laisse entrevoir de nombreuses possibilités de multi-marquage et de suivi de paramètres cellulaires.



**Figure 32. Principe de fonctionnement des photo-détecteurs.**

Les photons de faible énergie issus de l'excitation des fluorochromes se déplacent dans le tube de photomultiplicateur. Une fois à l'intérieur les photons entrent en collision avec une photocathode chargée négativement, et arrachent des électrons par l'effet photoélectrique. Les électrons émis sont envoyés vers une série de dynodes où ils sont continuellement accélérés par un champ électrique. A chaque stade de plus en plus d'électrons sont libérés, jusqu'à ce que ceux-ci atteignent finalement l'anode. Typiquement, pour chaque électron produit à la photocathode  $10^6$  électrons atteignent l'anode. Ce sont des détecteurs très sensibles avec un rapport signal sur bruit très faible. La photodiode est un composant réalisé à l'aide d'un semi-conducteur (jonction P-N) pour lequel les photons absorbés permettent le déplacement des électrons entre les deux couches. La photodiode émet un courant continu proportionnel à l'intensité lumineuse qu'elle reçoit. On la caractérise par son rendement quantique :

$$n = \frac{\text{électron fournis}}{\text{photons absorbés}}$$

Les détecteurs du Cell Lab Quanta SC-MPL sont au nombre de quatre : trois photomultiplicateurs (PMT), FL1, FL2 et FL3 et une photodiode pour le side-scatter (SC). Ce sont eux qui transforment le signal photonique en électrons (**Figure 32**). Les PMT sont soumis à une haute tension correspondant au paramètre intitulé Voltage. Le réglage du voltage est fondamental : il permet de caler le signal reçu dans les 4 décades de l'échelle arbitraire de fluorescence.

Les photomultiplicateurs (FL1, FL2, FL3) et la photodiode (SC) du Cell Lab Quanta possèdent tous des amplificateurs dont il est possible de régler le gain. C'est un circuit électronique capable d'amplifier les signaux linéaires de faible intensité. Lorsque le gain est augmenté, la résolution d'analyse des PMT sur les signaux les plus faibles est augmentée sans pour autant modifier la sensibilité de détection. Cela revient à amputer l'échelle d'un certain nombre de décades. Cependant, ces amplificateurs produisent un bruit de fond, il est donc préférable de modifier le voltage du PMT avant d'augmenter le gain. Les amplificateurs ont, de plus, deux échelles d'amplification : linéaire ou logarithmique. L'échelle linéaire est utilisée lorsque l'on cherche une proportionnalité dans les signaux (cas de l'analyse du cycle cellulaire). L'échelle logarithmique est utilisée pour visualiser des signaux présentant un très fort coefficient de variation (fluorescence 1000 fois supérieure entre une cellule fortement marquée et une cellule peu marquée).

La fluorescence peut aussi être exprimée dans 3 modes : FL, FL-FSD ou FL-FC. FL correspond à la fluorescence brute. FL-FSD est la densité de surface en fluorescence, rapport entre FL et la surface membranaire. FL-FC est la concentration cellulaire en fluorescence, rapport entre FL et le volume cellulaire. Pour une quantité identique de lumière FL émise, les modes FL-FSD et FL-FC permettent de différencier une grosse cellule peu fluorescente d'une petite cellule très fluorescente, dans le cas d'un marquage membranaire (FL-FSD) ou d'une sonde moléculaire (FL-FC), respectivement.

Le réglage fin de l'ensemble de ces quatre paramètres (voltage, gain, échelle et mode) permet de discriminer des populations cellulaires.

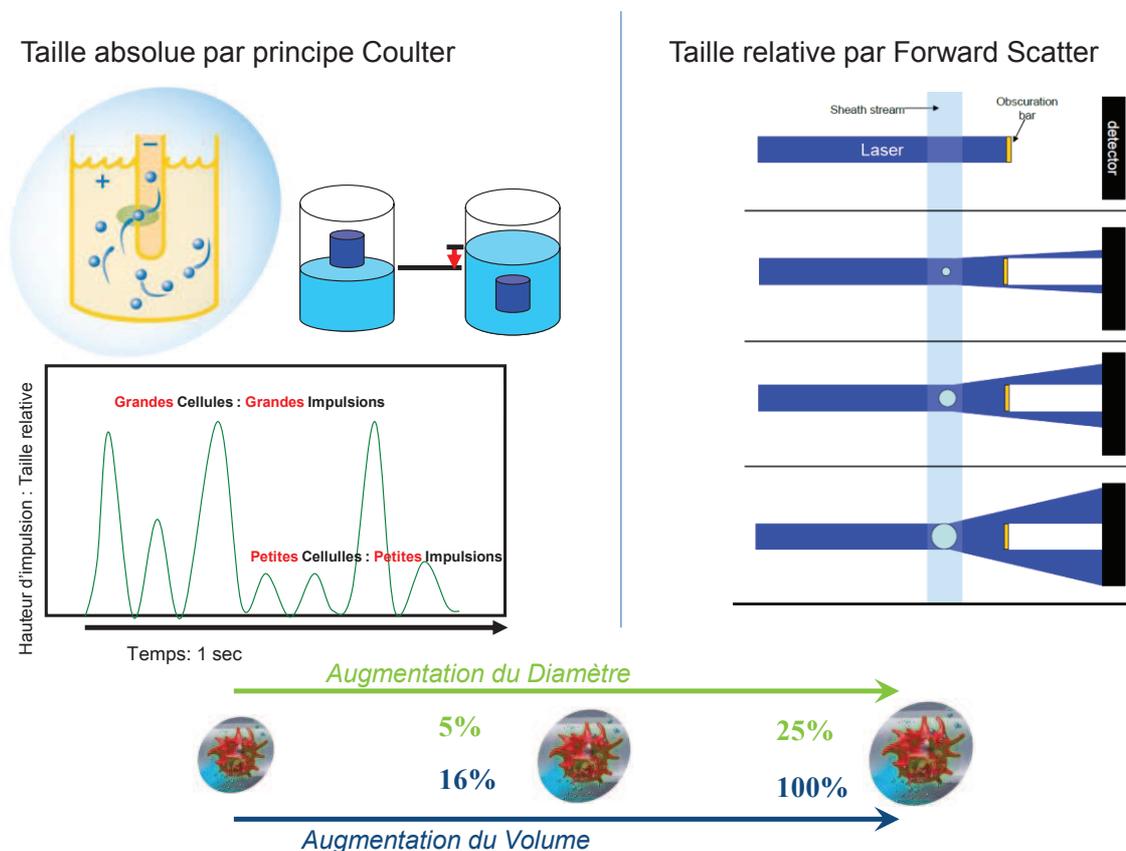
### ***III. La mesure du volume***

Contrairement à la plupart des cytomètres qui utilisent le forward scatter pour estimer le diamètre cellulaire, la flow-cell du Cell Lab Quanta est dotée d'un volume Coulter (**Figure 33**). Ce dernier permet de mesurer électroniquement le volume d'une cellule selon un principe

d'électricité relativement simple. Deux électrodes baignent de part et autre de la flow-cell dans le liquide de gaine conducteur (solution ionique). Lorsqu'une cellule passe entre elles, la résistivité augmente modifiant alors la tension aux bornes des électrodes, créant un pulse électrique, selon la loi d'Ohm :

$$U=RI$$

Cette modification se révèle être proportionnelle au volume d'électrolyte déplacé, lui-même égal au volume de la particule ; il est ainsi possible d'en déterminer la taille après avoir effectué une calibration grâce à des billes de calibration fluorescente de 10 µm : les FlowChecks.



### Figure 33. Mesure de la taille des particules en cytométrie

La mesure du volume par le principe Coulter est fondée sur la mesure de la résistance électrique formée par une particule à travers une ouverture immergée dans un tampon électrolytique. Quand une cellule passe par l'ouverture, la résistance augmente et une variation de potentiel est enregistrée. La variation du pulse est corrélée avec le volume cellulaire et un diamètre peut être calculé. La technique du Forward-scatter mesure la taille de la diffraction dans l'axe générée par une particule passant dans le trajet optique. Plus la taille de l'objet est grande plus la diffraction est grande. Il est intéressant de noter que lorsque le volume double, le diamètre n'augmente que de 25%. La mesure du volume apporte une meilleure précision que la mesure du diamètre.

#### ***IV. Le conditionnement du signal***

Dans le conditionnement du signal, il est important de noter deux paramètres fondamentaux : le déclencheur (trigger) et le seuil (threshold). Le déclencheur correspond au paramètre choisi par l'utilisateur pour que l'appareil reconnaisse un évènement et effectue une mesure. Le choix d'un paramètre de déclenchement pertinent permet d'éliminer les évènements indésirables qui parasitent le signal (débris cellulaires, agrégats de cellules...). Le déclenchement peut ainsi s'effectuer sur la taille des particules (cas en comptage), sur leur complexité ou sur la fluorescence (cas en analyse du cycle cellulaire).

Le seuil s'applique sur le paramètre de déclenchement choisi. Le Cell Lab Quanta possède deux seuils : un seuil bas, la LLD ( Lower Limit of Detection) et un seuil haut la ULD (Upper Limit of Detection). Le réglage du seuil est très important dans la qualité des résultats : si ce seuil est trop élevé, les particules les plus petites ne seront pas analysées (petites cellules) biaisant ainsi les résultats. A l'inverse si le seuil est trop bas, un grand nombre de débris seront analysés et nuiront à la qualité et à la précision des résultats.

# Chapitre 3. Imagerie

## I. Equipement

Les expériences d'imagerie ont été réalisées au laboratoire sur un microscope inversé TE-2000 (Nikon, Champigny-sur-Marne, France) équipé pour l'épifluorescence et l'imagerie time-lapse. L'épifluorescence est assurée par une lampe à vapeur de mercure (Lampe HBO) comme source lumineuse d'excitation. La fluorescence émise est filtrée spécifiquement en fonction de la sonde fluorescente utilisée. Une caméra à couplage de charge (CCD : charge-coupled device) à haute résolution permet de réaliser des vidéos microscopie en time-lapse (CoolSnap EZ; Photometrics, Tucson, AZ, USA). Un contrôleur de température Peltier (PDMI-2 et TC-202A, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) maintient la préparation à 14°C pour l'imager des cellules vivantes sur le long terme (**Figure 34**).

Afin d'obtenir un champ large contenant un nombre important de cellules individualisées présentant des noyaux « ponctuels » en imagerie time-lapse en épifluorescence, un objectif x10 (ouverture numérique 0,3) est utilisé. Afin de protéger les préparations du photoblanchiment et de la phototoxicité, un obturateur VCM-D1 (Uniblitz, Vincent Associates, Rochester, NY, USA) a été ajouté sur le trajet de l'illumination pour couper la lumière d'excitation entre deux prises d'images.

La camera CCD ainsi que l'obturateur sont contrôlés par le logiciel d'acquisition Metamorph (Device moléculaire, Sunnyvale, CA, USA). La caméra Coolsnap capture une image numérique 12 bits de 1 392x 1 040 pixels en niveaux de gris toutes les 30 s pendant 30 min.

Les images obtenues en transmission classique sont acquises avec un objectif x40 à contraste d'Hoffman (ouverture numérique 0,55). Dans ce cas précis 1 pixel représente un carré de 6,45x6,45  $\mu\text{m}$ . La caméra et le logiciel ont été calibrés avec les 2 objectifs utilisés afin d'exprimer les distances en microns.



**Figure 34. Poste d'imagerie dynamique cellule.**

*Le poste d'imagerie est composé d'un microscope inversé à epifluorescence (TE-2000, Nikon) équipé d'une caméra CCD CoolSnap EZ. En insert : platine thermostatée équipée pour le renouvellement du milieu de culture*

## ***II. Le tracking cellulaire***

Pour quantifier leur vitesse, les cellules en culture sont incubées avec  $10 \mu\text{M}$  d'une sonde fluorescente spécifique des noyaux, le Hoechst 33342 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), pendant 30 min à  $14^\circ \text{C}$ . La boîte de culture est ensuite transférée sous le microscope pour enregistrer des vidéos. Les vidéos sont importées dans le logiciel d'analyse Metamorph où l'application Track Objects (disponible avec l'option : Multi-Dimensional Motion Analysis) peut être exécutée. Vingt noyaux sont choisis au hasard pour être suivis. Les données extraites sont transférées à une feuille de calcul et, pour chaque cellule, la distance moyenne parcourue pendant 30 s a été calculée et multipliée par deux pour exprimer la vitesse en  $\mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ .

## *Chapitre 4. Culture Hémocytaire*

Les animaux sont classiquement prélevés sur deux sites différents : l'un se trouvant être le bassin Vétillard au Havre, et l'autre à Yport sur le lieu-dit des « 3 sources ». Les moules prélevées sur ce dernier site sont conservées entre 2 à 4 semaines dans un aquarium marin Nanocube (Sera, Heinsberg, France) à une température de 14°C. La circulation et l'oxygénation de l'eau sont assurées par pompes et bulleur.

200 µL d'hémolymphe sont prélevés par ponction dans le muscle adducteur postérieur à l'aide d'une seringue de 1 mL et d'une aiguille de 22 gauges. L'hémolymphe est déposée au centre d'une boîte de pétri de 35mm, puis laissée 15 minutes à température ambiante afin de laisser sédimenter les cellules. Les hémolymphe collectées de différents animaux ne sont jamais assemblées, garantissant ainsi une analyse à l'échelle individuelle.

Les cellules sont ensuite cultivées dans 2 mL de MM199 (M199 à 11 g.L<sup>-1</sup> additionnés de, en mM : 250 NaCl ; 10 KCl ; 2,5 CaCl<sub>2</sub> ; 11 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (Hepes) ; 25 MgSO<sub>4</sub>, ; filtré à 0,22 µm) supplémentés de 2 mM de L-glutamine, d'un cocktail d'antibiotiques : 100 µg.mL<sup>-1</sup> de streptomycine et 60 µg.mL<sup>-1</sup> penicillin G. Les cultures sont placées à 14°C dans un incubateur réfrigéré.

Pour la cytométrie, les cellules sont décollées, après rinçage, par une solution de trypsine (5mg.ml<sup>-1</sup>) / EDTA (1%) remise à pression osmotique marine avec une solution de MPSS 3x. L'analyse cytométrique est directement réalisée dans le mélange cellulaire contenant la trypsine.



# ***RESULTATS***

---



## Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulation by single cell time-lapse motility imaging

Le Foll, F., Rioult, D., Boussa, S., Pasquier, J., Dagher, Z., & Leboulenger, F.  
(2010).

Chez les mollusques bivalves, la défense contre les pathogènes repose principalement sur l'infiltration rapide des tissus par les hémocytes immunocompétents. Ces derniers migrent de l'hémolymph vers les sites d'infection, afin de délivrer, *in situ*, une réponse immunitaire efficace. Dans le présent travail, nous avons étudié la dynamique motile des sous-populations hémocytaires en combinant la cytométrie en flux couplée à la détermination cellulaire volume par Coulter, la microscopie à contraste d'Hoffman, l'imagerie time-lapse et d'analyse hors ligne des changements de forme des cellules. Nos résultats ont révélé des modifications rapides, de l'ordre de la minute, de l'aspect des hémocytes *in vitro*, avec des transitions bidirectionnelles des corps cellulaires passant d'une forme étalée à condensée. Des modes de locomotion amiboïdes et non-amiboïdes ont été observés, en fonction de la forme des cellules et du sous-type cellulaire, avec des vitesses pouvant atteindre jusqu'à 30  $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ . Les corrélations entre les profils de mouvement, la coloration Hemacolor et l'analyse de cytométrie en flux sur des cellules vivantes aident à proposer une classification fonctionnelle des hémocytes de moule, incluant les propriétés mobiles de ces cellules. En particulier, les basophiles sont révélés être impliqués dans des interactions dynamiques hémocyte-hémocyte et dans la constitution de noyaux d'agrégation. L'implication physiologique, en termes de réponse immunitaire chez ces organismes dépourvus de système vasculaire endothélial clos, et les applications potentielles de l'étude de la motilité des hémocytes pour le développement et l'interprétation des expériences impliquant des hémocytes dans le domaine de l'écotoxicologie marine sont discutées.

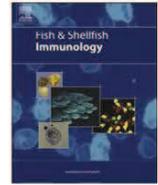
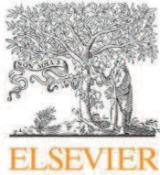
*Fish Shellfish Immunol*, 28(2), 372-386.

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.011>

# Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging

2010  
Fish and Shellfish Immunology

Di	P	H	Te	R	I	C
Données initiales	Problèmes	Hypothèses	Tests	Résultats	Interprétations	Conclusions
<ul style="list-style-type: none"> <li>Plusieurs travaux suggèrent l'existence de sous-populations hématocytaires chez <i>Mytilus</i> sp.</li> <li>L'organe hématopoïétique est inconnu. La durée de vie, les étapes de maturation et les fonctions spécifiques des sous-types hématocytaires restent ignorés.</li> <li>La classification actuelle repose sur des critères morphologiques, uniquement sur cellules fixées.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Il n'y a pas de consensus sur la désignation et les caractéristiques des sous-types hématocytaires.</li> <li>Absence de marqueurs moléculaires.</li> <li>Peu de données sur la motilité des hématocytes et leur migration dans les tissus.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La mesure des mouvements (déplacements et déformations) d'hématocytes vivants en culture pourrait apporter de nouvelles données utiles à la différenciation des sous-types cellulaires et à la compréhension de leurs fonctions.</li> <li>Les approches analytiques objectives et quantitatives sont à privilégier.</li> <li>Des corrélations entre les techniques déjà utilisées et les nouvelles approches peuvent améliorer le consensus.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Introduction de la mesure du volume Coulter.</li> <li>Introduction de la vidéo-microscopie pour visualiser les mouvements cellulaires.</li> <li>Corrélations techniques entre les colorations cytochimiques classiques, la cytométrie en flux (incluant la phagocytose) et vidéomicroscopie.</li> <li>Analyse du morphogramme pour comprendre les déformations cellulaires.</li> <li>Pistage des cellules pour quantifier des paramètres vélocimétriques.</li> </ul>	<p>Une classification caractérisant partiellement trois sous-types d'hématocytes est proposée:</p> <p>1/ les basophiles sont des petites cellules (<math>\emptyset</math> suspension 7 <math>\mu\text{m}</math>) au cytoplasme basique avec peu de granules et une activité phagocytaire réduite. Ils présentent des mouvements rapides et forment le cœur des agrégats. Ils constituent des interactions cellule-cellule avec les autres hématocytes.</p> <p>2/ les granulocytes éosinophiles sont des cellules de plus grande taille (<math>\emptyset</math> suspension 10 <math>\mu\text{m}</math>), chargées de granules acides (ROS). Ce sont des phagocytes très étalés (<math>\emptyset</math> en culture 20 <math>\mu\text{m}</math>), présentant des déplacements amoiboïdes lents (6 <math>\mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}</math>). Ils sont capables de se condenser en quelques secondes et d'adopter un déplacement rapide par filopodes (30 <math>\mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}</math>).</p> <p>3/ les hyalinocytes sont des grandes cellules très étalées, comparables en taille aux éosinophiles mais sans granules acides. Parfois cette population semble absente. Parfois ces cellules présentent un cytoplasme très vacuolé. Ces cellules peuvent aussi se condenser rapidement.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Parfois, seulement 2 types cellulaires sont observés en cytométrie, les basophiles et les éosinophiles, Pourquoi ?</li> <li>Quelle est la fonction des interactions basophiles/cellules étalées ?</li> <li>La méthode du tracking cellulaire n'est pas satisfaisante car elle n'est pas automatisable avec des objets qui se déforment. Pour une analyse objective et quantitative, il faut pouvoir suivre un grand nombre de cellules dans le temps. Le développement d'une méthode adaptée est nécessaire.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Les hématocytes sont des cellules très motiles.</li> <li>Le suivi du déplacement est possible par tracking cellulaire. L'analyse des déformations à l'aide de morphogrammes révèle une très grande plasticité des cellules étalées.</li> <li>Les classifications fondées sur des critères morphologiques sont à abandonner car les cellules se déforment très rapidement.</li> </ul>
Données post-étude						
<b>Dpe</b>						<b>NP ...</b>



## Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging

Frank Le Foll<sup>a,\*</sup>, Damien Rioult<sup>a</sup>, Sofiane Boussa<sup>b,1</sup>, Jennifer Pasquier<sup>a</sup>, Zeina Dagher<sup>c</sup>, François Le Boulenger<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Ecotoxicology, University of Le Havre, EA 3222, IFRMP 23, BP 540, 76058 Le Havre cedex, France

<sup>b</sup>Electrical Engineering and Automation Research Group (GREAH), EA 3220, University of Le Havre, BR 540, 76058 Le Havre cedex, France

<sup>c</sup>Department of Biology, Lebanese University, Faculty of Sciences II, P.O. Box 90-656, Jdeidet El, Matn, Lebanon

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 September 2009

Received in revised form

28 October 2009

Accepted 14 November 2009

Available online 26 November 2009

#### Keywords:

Invertebrate

Innate immunity

Hemolymph

Mussel blood cells

Dynamic microscopy

### ABSTRACT

In bivalve molluscs, defence against pathogens mainly relies on fast tissue infiltration by immunocompetent hemocytes that migrate from circulating hemolymph to sites of infection, in order to deliver, *in situ*, an effective immune response. In the present work, we have investigated dynamics of hemocyte subpopulations motility by combining flow cytometry coupled to Coulter-type cell volume determination, Hoffman modulation contrast microscopy, time-lapse imaging and off-line analysis of cell shape changes. Our results revealed fast modifications of hemocyte aspect *in vitro*, with bidirectional transitions from spread outlines to condensed cell body morphologies, in the minute range. Amoeboid or non-amoeboid types of locomotion were observed, depending on the cell shapes and on the cell subtypes, with velocities reaching up to  $30 \mu\text{m min}^{-1}$ . Correlations between motion profiles, Hemacolor staining and flow cytometry analysis on living cells help to propose a functional mussel hemocyte classification including the motile properties of these cells. In particular, basophils were shown to be involved in dynamic hemocyte–hemocyte interactions and in the constitution of aggregation cores. Physiological implications, in terms of immune response in organisms devoid of endothelium-closed vascular system, and potential applications of hemocyte motility studies for the development and the interpretation of experiments involving hemocytes in the field of marine ecotoxicology are discussed.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

In most invertebrates, the circulatory system is devoid of endothelial-closed vessels. The vascular network derives from the hemal cavity and consists in large sinuses, lacunae and spaces, lined by basement membranes from different types of epithelia and filled by circulating hemolymph (for reviews see [1,2]). The hemolymph compartment plays a key role in the immune defence against pathogens that relies on a range of exclusively innate humoral and cellular strategies. The cells principally involved are collectively called hemocytes, among the tremendous diversity of living invertebrates [3]. In bivalve molluscs, as in other invertebrates, hemocytes are circulating and also sessile cells which perform a number of crucial immune functions [4] including secretion of antimicrobial peptides such as defensins or mytilins [5,6], production of reactive oxygen and nitrogen species [7–10], release

of zymogens of the prophenoloxidase cascade [11], phagocytosis [12,13] and also probably wound healing. In these animals, characterized by both an open vascular system and the absence of adaptive immune cells capable of memory and clonal expansion, fast tissue infiltration by migration of hemocytes from hemolymph to sites of infection is determinant to deliver, *in situ*, an effective immune response.

Immune cell motility is characterized by progressive asymmetrical changes in membrane margins morphology, leading to cell polarization and finally to cell crawling [14,15]. In a pioneering work in 1972, Davies et al. have described limpet hemocyte fast shape changes, locomotion, spreading and aggregation [16–18]. By using global methods to evaluate hemocyte adherence to substrate (relative reflectance) [19] or form modifications (form factor computation) [20], evidence for a role of opioid peptides and LPS [21] as immunoregulators in *Mytilus edulis* has been reported. In a comparative study using human monocytes, granulocytes and endothelial cells as well as *M. edulis* hemocytes, it has been shown that morphine provokes a nitric oxide-mediated modification of the cell amoeboid shapes towards a more rounded morphology [22]. Using the same approach, recombinant human interleukin-8

\* Corresponding author. Tel.: +33 (0) 2 32 74 43 04; fax: +33 (0) 2 32 74 43 14.  
E-mail address: [frank.lefoll@univ-lehavre.fr](mailto:frank.lefoll@univ-lehavre.fr) (F. Le Foll).

<sup>1</sup> Present address: ALTEN Benelux, Gulledele 92, 1200 Brussel, Belgium.

has also been shown to affect *Mytilus galloprovincialis* hemocyte shapes and chemotaxis [23]. All these studies, focused on mussel hemocyte activation/morphology relationships, shared a similar approach, based on static end-point evaluations of cell shapes within an hemocyte population considered as a single set of immunocytes. This latter assumption appears now to be a coarse approximation. Indeed, in *Mytilus* sp, different types of hemocytes have been described [24–29]. However, among those various studies, the classification of hemocyte subpopulations in mussels, and more generally in bivalves, remains largely controversial. The absence of consensus can be ascribed to two main reasons. On one hand, information is still missing to propose a synoptic and consistent classification of mussel hemocytes. In particular, the origin, life cycle and life span of hemocytes remain largely unknown and the role of each cell type has not been completely elucidated [30]. On the other hand, the discrepancies in identified hemocyte subpopulations can be accounted for by the diversity of experimental techniques employed. In fact, data obtained separately by morphological, cytochemical or flow cytometry studies can not be easily merged into a conclusive scheme. Moreover, fast shape changes associated to hemocyte motion certainly introduce a cell plasticity making difficult morphological classifications in fixed cell preparations.

Herein, we have developed a simple method for quantifying and plotting, in a single morphogram, dynamics of cell edges on short time scales (<30 s) and at the submicrometric level. This method has been used in combination with classical cytochemistry and flow cytometry analysis coupled to Coulter-type cell volume determination in order to understand the nature of *M. edulis* hemocytes motility and to explore its contribution to the apparent subpopulations diversity.

## 2. Material and methods

### 2.1. Reagents

All compounds were of the highest available grade of purity. Most were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Flow cytometry sheath fluid Marine Isodiluent and quality control FlowCheck microspheres were purchased from Beckman Coulter (Fullerton, CA). Hemacolor was supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

### 2.2. Mussel collection

Adult mussels (4–5 cm shell length), *M. edulis*, were collected on the intertidal rocky shore of Yport (Seine-Maritime, France). Mussels were transported to the laboratory and placed in a temperature-controlled (8 °C) aerated Biotop Nano Cube 60 seawater aquarium (Sera, Heinsberg, Germany), equipped with mechanical and activated biological filtering. The animals were maintained in these conditions for at least one week before use.

### 2.3. Hemolymph withdrawal

Typically, hemolymph was aseptically withdrawn, in a BSL2 laminar flow cabinet, from the posterior adductor muscle sinus, by gentle aspiration with a 1 mL syringe equipped with a 22G needle. Unless otherwise indicated, hemolymph was collected from single individuals, without pooling and centrifugation. If not used in crude hemolymph, hemocytes were counted in a Malassez chamber and diluted at the desired concentration by using marine physiological saline solution (MPSS)[31], containing (in mM): 470 NaCl, 10 KCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 10 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (Hepes), 48.7 MgSO<sub>4</sub>, pH 7.8, 0.2 µm filtered. Osmolality of MPSS

was checked to be close to local seawater osmolality (963 mOsmol kg<sup>-1</sup>) by using a vapour pressure osmometer (Wescor Elitech, Logan, UT).

In some experiments, to impair hemocyte clotting, the syringe used to collect the hemolymph was pre-filled with 500 µL anti-aggregative Alsever solution (ALS) modified from [32], containing (in mM): 382 NaCl, 27 Na citrate, 11.5 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 115 glucose, pH 6.4, 0.2 µm filtered.

### 2.4. Cytochemistry and epifluorescence imaging

For hemolymph formed elements determination, one drop of hemolymph was placed on a glass coverslip and allowed to adhere for 30 min. Hemacolor staining was performed without air-drying and according to the manufacturer's recommendations. Microscopic fields were imaged under Koehler illumination by a ×60 water-immersion objective with numerical aperture 1.20 and a D40 digital camera (Nikon, Champigny-sur-Marne, France). Post-acquisition image processing was performed using IRIS 5.55 (available at <http://www.astrosurf.com/buil/us/iris/iris.htm>).

To prepare slides for epifluorescence microscopy,  $5 \times 10^5$  cells were seeded on sterile glass coverslips placed in the bottom of a 35 mm culture dish (Corning, New-York, NY). Cells were washed twice with MPSS, fixed for 5 min in ice-cold 3.7% formaldehyde in MPSS and then permeabilized with 0.1% Triton X-100 in MPSS. After rinsing three times with MPSS, hemocytes were incubated in 10 µM fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated phalloidin (Sigma–Aldrich) for 40 min at room temperature. For nuclei counterstaining, hemocytes were then incubated with 10 µM Hoechst 33342 for 15 min. Thereafter, cells were rinsed in MPSS, and then mounted in Mowiol 4–88 (Sigma–Aldrich). After polymerization of the anti-fade medium, slides were placed on the stage of a TE-2000 inverted microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France) equipped for epifluorescence. Fluorescent emissions were collected by a ×40 oil-immersion objective with numerical aperture 1.30 and imaged on a C4742 CCD camera (Hamamatsu photonics, Sunayama-cho, Japan). The images were tint and merged by using the imaging software Wasabi 1.5 (Hamamatsu photonics, Sunayama-cho, Japan). Hoffman modulation contrast optics were used to obtain cell images before and after the fluorescence imaging.

### 2.5. Flow cytometry

Freshly collected hemocytes were analyzed in crude hemolymph or in ALS by a Cell Lab Quanta SC MPL flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA) equipped with a 22 mW 488 nm excitation laser. Crude hemolymph samples containing hemocyte aggregates were discarded. Marine Isodiluent of seawater osmolality was used as sheath fluid. Cytometer settings were not modified throughout the experiments. Each analysis consisted in a record of 20 000 events, triggered on electronic volume (EV) as primary parameter, according to a particle diameter exceeding 5.5 µm. Usually, the cytometer was operated at a flow rate of 30 µL/min. Particle sizes were accurately determined by using the Coulter-type electronic volume (EV) channel of the cytometer, after calibration with 10-µm FlowCheck microspheres. Cell diameters were thereafter directly expressed in µm. Cellular complexity was evaluated as a function of the amount of laser light deviated at 120° in the analysis chamber and collected by the side-scatter (SS) photodetector. EV and SS gains were 2.74 and 3.60, respectively. Quantitative data are expressed as means ± S.E.M.

In some experiments, hemocytes were stained with eosin prior to flow cytometry. For that purpose, 1 mL of hemolymph collected in ALS were placed in 35 mm culture dishes (Corning, New-York, NY), rinsed, covered by 2 mL of MPSS and allowed to adhere for

30 min at room temperature. Spread cells were then washed twice with MPSS and detached by replacing for 10 min the bathing medium with a calcium-free trypsin/EDTA solution supplemented with NaCl to be adjusted to seawater osmolality. Dispersed cells were centrifuged ( $231 \times g$ , 5 min) and resuspended in 200  $\mu\text{L}$  ALS. Drops of cell suspension were dispensed in 2 mL of ice-cold methanol. Fixed cells were collected by centrifugation and stained in the Hemacolor eosin solution. Stained cells were centrifuged and washed twice in ALS before analysis by flow cytometry. Eosin fluorescence was excited by the 488-nm laser line and measured in the FL1 channel (log scale) through a 525 nm band pass filter.

## 2.6. Phagocytosis assays

Five hundred microlitres of crude hemolymph were placed in 24-well cell culture plates and allowed to adhere for 30 min at room temperature. Cells were covered by 2 mL of MPSS. Two-microlitres of carboxylate-modified fluorescein-labelled 2  $\mu\text{m}$  latex beads (Invitrogen, Carlsbad, CA) were added at a concentration of  $6 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$  in order to give a minimum bead to cell ratio of 50:1 for the highest total hemocyte concentration established by flow cytometry. After a 2-h incubation in the dark at room temperature, wells were washed twice with MPSS to remove unphagocytosed particles. Cells were resuspended in 2 mL of calcium-free trypsin/EDTA solution adjusted to seawater osmolality. The dispersed cell suspension was directly analyzed by flow cytometry in the FL1 channel (log scale) through a 525 nm band pass filter. Positive phagocytic cells were defined as cells containing one or more fluorescent microspheres. No differences were observed in samples supplemented with 50  $\mu\text{L}$  of 0.8% trypan blue in MPSS prior to analysis to quench fluorescence of latex beads externally adsorbed onto cells.

## 2.7. Live cell time-lapse microscopy and sequence analysis

One hundred microlitres of freshly withdrawn hemolymph were placed in a 35 mm non treated polystyrene culture dish (BD Falcon Easy Grip, BD, NJ). Cells were allowed to adhere for 30 min at room temperature and covered by 2 mL of MPSS. The culture dish was transferred on the stage of a TE-2000 inverted microscope equipped with a  $\times 40$  Hoffman modulation contrast objective (numerical aperture 0.55). Time-lapse recordings were performed at room temperature by using Wasabi 1.5 as acquisition software. A C4742 charge-coupled device camera captured 8-bit digital  $1344 \times 1024$  pixels greyscale images every 30 s for 30 min. The imaged microscopic fields sized  $215 \times 164 \mu\text{m}$ .

We have developed a specific MatLab (The Mathworks, Natick, MA) program to process off-line each individual image of the time-lapse sequence, to compute velocimetric parameters of the cell (trajectory, mean velocity, instantaneous velocity, distance of displacement, angles of motion and cell surface) and to plot the final graphs. The main goal was to quantify membrane deformations during cell displacements by monitoring expansions of the membrane margin with respect to the cell centroid, as already done in rabbit osteoclasts [33] and in mouse embryonic fibroblasts [34]. Briefly, the method proceeds as follow (see Fig. 8):

- (1) Cells ( $n = 20$ ) were chosen for analysis by visual inspections of time-lapse sequences.
- (2) For each cell, the membrane margin was manually outlined.
- (3) The resulting one-bit image was used to calculate the distance from the centroid to the outline edge of the cell along rays pointing outwards at regularly spaced angles. A number of 360 rays was sampled for each cell.

- (4) This process was repeated for each image of the time-lapse sequence (usually 50–60 images). The result corresponds to a polar coordinate representation of cell edge and details the dynamics of centroid/edge radius at each particular angle.
- (5) All the polar representations were converted in Cartesian coordinates and stacked in a 3-D-map, giving the expansion of membrane edges at different angle as a function of time.
- (6) The 3-D-map is then colour-coded and represented by a two dimensional graph, called morphogram.

Our technique allows to easily visualize, in a single representation, the time course of cell shape changes in Cartesian coordinates by displaying the cell radius variations at different angles.

## 3. Results

### 3.1. Adherent formed elements of hemolymph

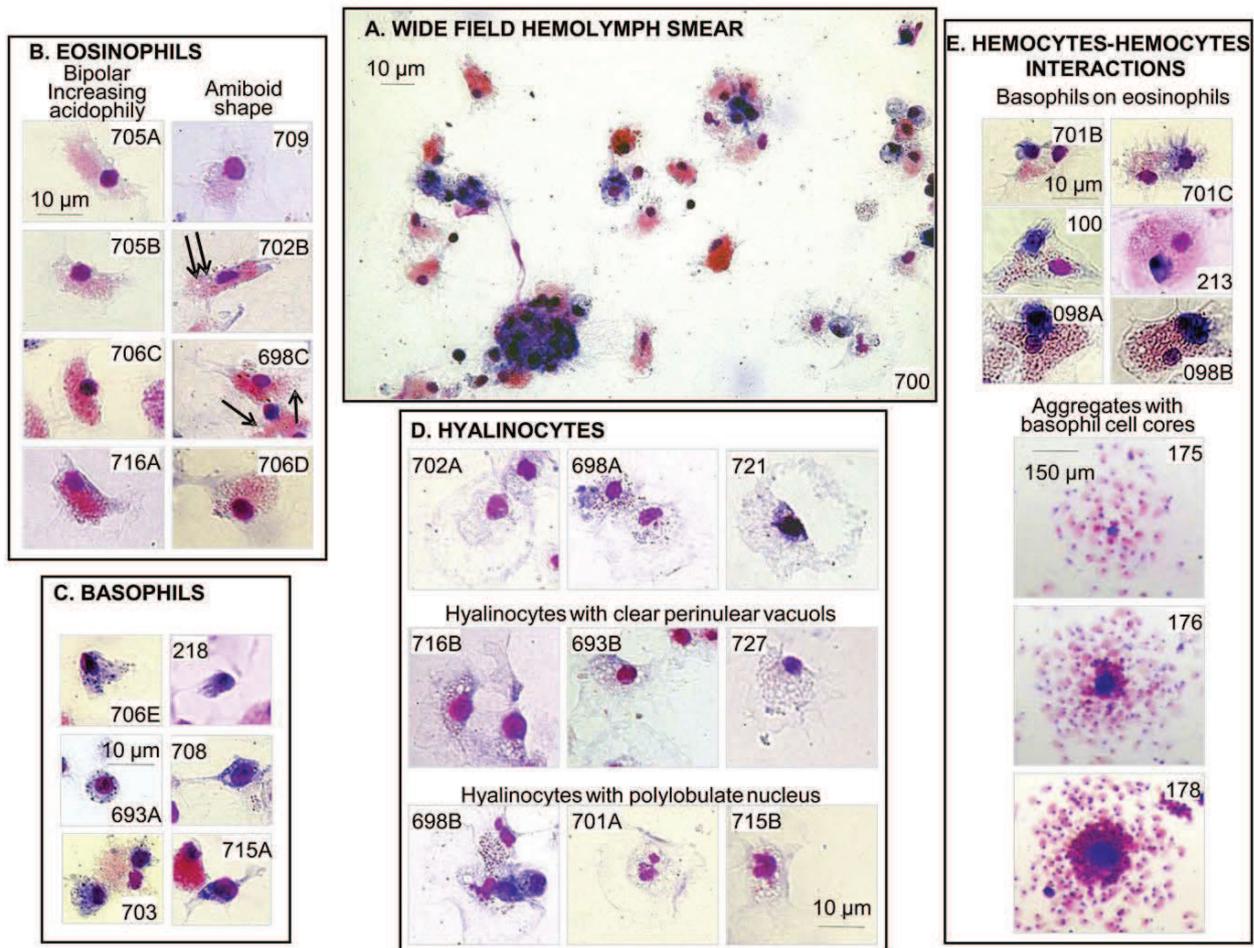
Direct Hemacolor cytologic staining of *M. edulis* hemolymph smears revealed a variety of isolated or aggregated cells exhibiting different sizes, morphologies and colours (Fig. 1A). A great number of cells exhibited small brick-red granules within cytoplasm (Fig. 1B). These cells are identified as eosinophilic granulocytes, according to the manufacturer's recommendations for interpreting typical hematologic staining. Eosinophils were of heterogeneous acidophily, from light to intense red, and of different morphologies but are always observed as spread cells. Eosinophils sometimes contained larger uncoloured vesicles, probably corresponding to phagosomes. A second subpopulation of hemocytes was characterized by a small number of large dark violet to black granules, a tiny dove-blue cytoplasm and, thus, a high nucleus/cytoplasm ratio (Fig. 1C). These cells correspond to basophils. The basophilic granules are more clearly identified upon osmotic swelling (picture #693A). Another type of hemocytes did not display coloured granules nor stained cytoplasm background. They are therefore named hyalinocytes (Fig. 1D). Hyalinocytes formed a relatively heterogeneous hemocyte population of very weak contrast under bright field microscopy. Some of them contained several large lucent vacuoles similar to phagosomes. Others exhibited a polylobulate nucleus. Hyalinocytes are very often observed as spread cells with low nucleus/cytoplasm ratios.

In fixed hemocyte preparations, the number of contacting cells was high. Frequently, basophils settle on spread cells – eosinophils (Fig. 1E) or hyalinocytes (picture #698B). Mechanical stimulations, such as vigorous pipetting, promoted intense cell aggregation. Hemocytes aggregates were of various dimensions but shared a constant feature, they were constituted of a basophilic core surrounded by an eosinophilic corona (pictures #175, 176, 178).

### 3.2. Subpopulations in mono-dispersed hemocyte suspensions

We took advantage of a flow cytometer equipped with a Coulter-type cell volume (or diameter) determination device to research different hemocyte subpopulations in crude hemolymph samples collected from individual mussels. Suspension of living hemocytes were unambiguously separated, at most, in three clustered dot clouds (Fig. 2A), according to the criteria of cell size (EV, Fig. 2B), expressed in  $\mu\text{m}$ , and of the cell complexity (SS, Fig. 2C).

The subpopulation 3 consisted in a homogeneous set of small cells ( $7.14 \pm 0.05 \mu\text{m}$  in diameter) with a low SS ( $139 \pm 3$ ,  $n = 3$ ). In the subpopulation numbered 2, cells were larger in size ( $9.97 \pm 0.17 \mu\text{m}$  in diameter) and showed a higher degree of complexity (mean SS values  $306 \pm 13$ ,  $n = 3$ ). The subpopulation numbered 1 was composed of slightly larger cells ( $10.08 \pm 0.24 \mu\text{m}$  in diameter) having the highest and the most dispersed complexity (mean SS values



**Fig. 1.** Formed elements observed in *Mytilus edulis* hemolymph smears after staining with Hemacolor. A, representative micrograph showing the diversity of cell shapes and arrangements in a drop of hemolymph gently plated on a glass coverslip and stained with Hemacolor. B, eosinophil hemocytes appear with small red granules in cytoplasm. Acidophilia is heterogenic between cells, with staining ranging from light to intense red. Eosinophils often adopt a bipolar bean shape (left column), whereas others present an undefined amoeboid outline. In some cells, large clear vacuoles are identified (arrows, #702B & #698C). C, basophil hemocytes are characterized by a tiny purple cytoplasm containing large dense granules clearly visible after osmotic swelling (#693A). These cells exhibit either a triangular shape (#706E, #703, #213), or a polar filipodia bush (#218). D, hyalinocytes do not show any staining with Hemacolor and are more spread on the substrate. Some hyalinocytes display clear vacuoles around the nucleus (second line), others have a multilobed nucleus (third line). On picture #698B, two basophils are associated to two hyalinocytes. E, hemocytes display cell to cell interactions. Frequently, basophils settle on eosinophils (the 6 pictures on top, #698C, #703). Another outstanding characteristic of hemolymph formed elements is their capability to aggregate upon mechanical stress. Aggregates are roughly circular with, systematically, a dense core constituted by a compact mass of basophils, surrounded by a crown of eosinophils. Three aggregates of different sizes seen under identical magnification are presented on pictures #175, 176 & 178. These structures were obtained by vigorous pipetting before plating.

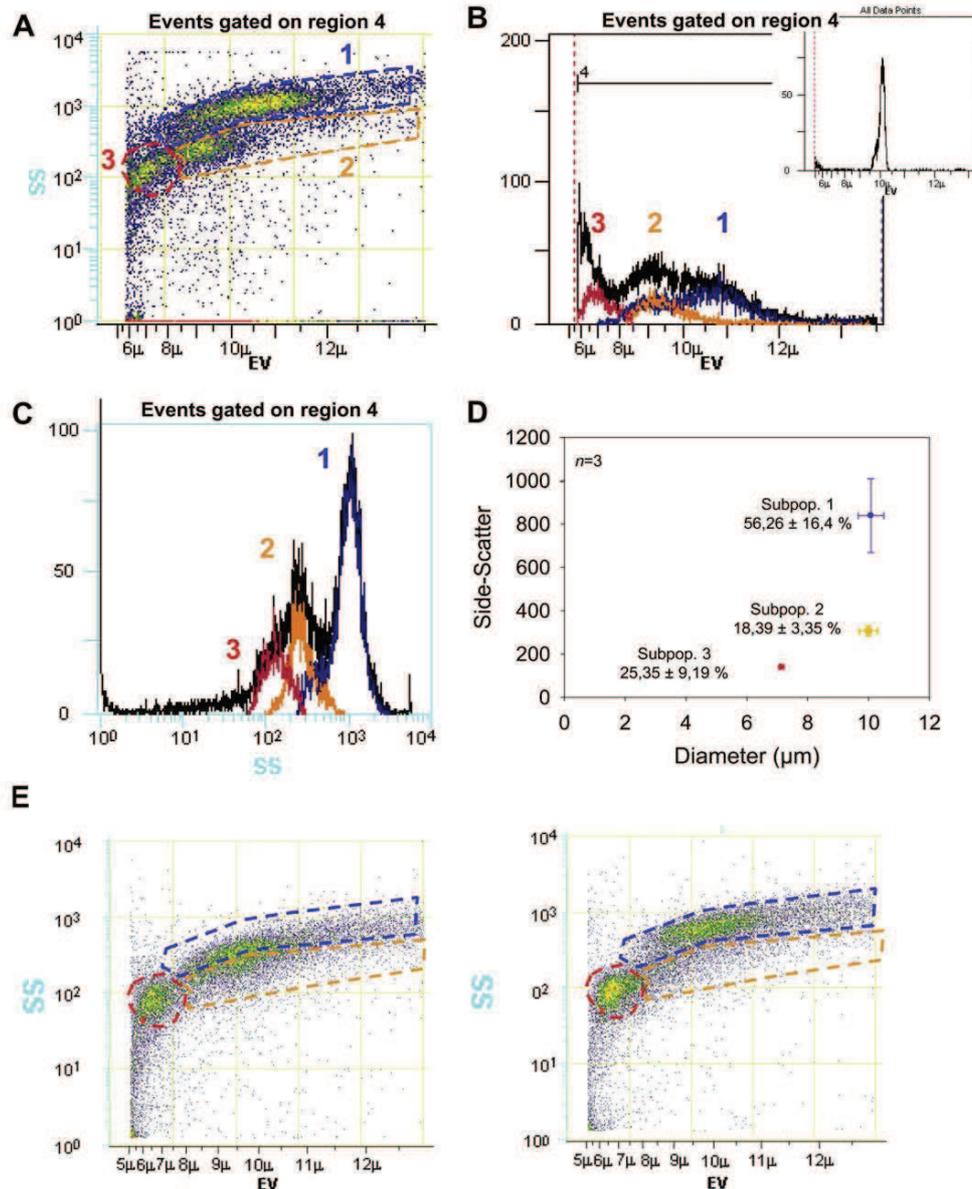
839 ± 98, n = 3). The relative proportions of the different hemocyte types were 25.35 ± 9.19%, 18.39 ± 3.35% and 56.26 ± 16.40%, for subpopulations 3, 2 and 1, respectively (n = 3, Fig. 2D).

In some samples however, flow cytometry analysis plainly resolved no more than two distinct hemocytes subpopulations, as shown in the representative dot-plots of Fig. 2E.

Very fast spontaneous cell aggregation is one of the striking features of crude hemolymph handled without extreme care. For that reason, hemolymph collection is sometimes carried out in the presence of a calcium-free Alsever-type (ALS) anti-aggregative balanced salt solution [32]. To investigate whether ALS affects hemocyte subpopulations determination, flow cytometry analysis were repeated with samples obtained after 50:50 hemolymph:ALS dilutions (Fig. 3). Results demonstrate that, similarly to crude hemolymph, a maximum of three separated hemocyte subpopulations can be distinguished. Cell diameters, 7.09 ± 0.07 μm, 9.77 ± 0.06 μm and 9.70 ± 0.09 μm (n = 6), and SS values 133 ± 3, 317 ± 8 and 770 ± 39 (n = 6), are comparable to those obtained in

crude hemolymph for subpopulations 3, 2 and 1, respectively. It should be noticed that, in all flow cytometry analysis experiments a software gating region (region 4) were set in order to eliminate cell doublets cell aggregates. As for crude hemolymph analysis, in some samples mixed with ALS, only two subpopulations could be resolved (data not shown).

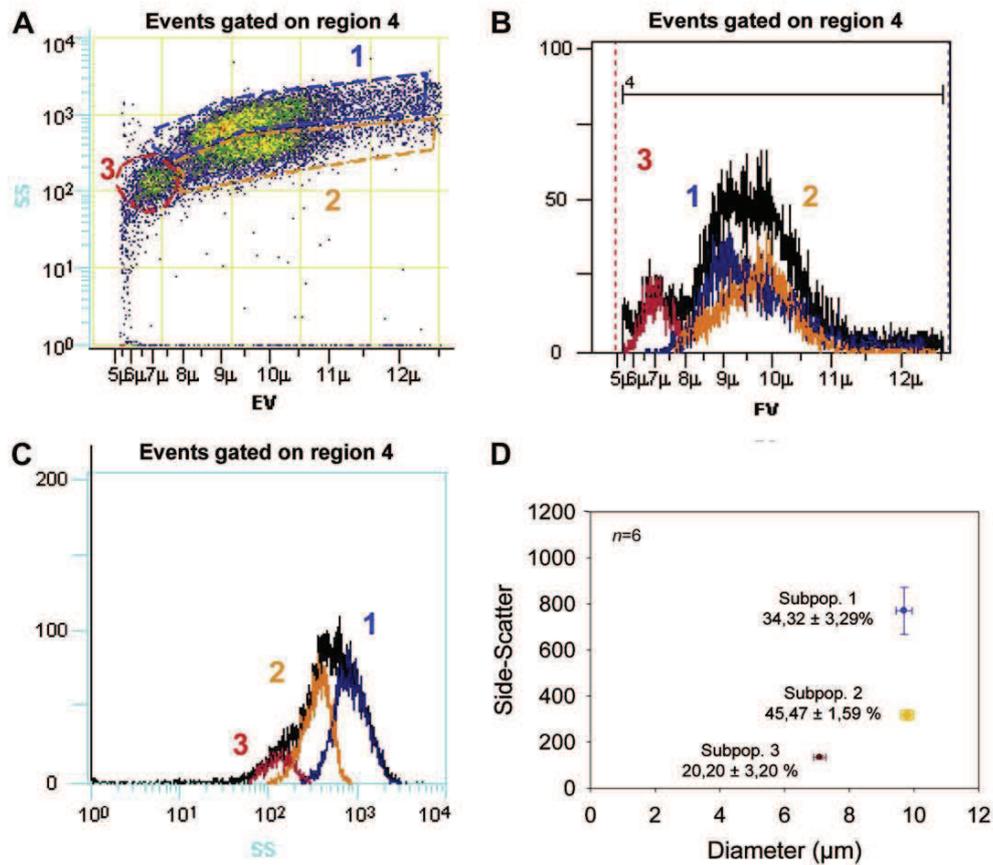
In order to correlate the regions obtained in the EV/SS plots to the different cell types identified under light microscopy after Hemacolor staining, eosin fluorescence was measured by flow cytometry. For that purpose, freshly collected hemocytes were fixed and permeabilized in methanol and stained with eosin only. Fig. 4A shows that, despite a drop in the electronic volume signal due to sample permeabilization and fixation, hemocytes having the highest fluorescent content are principally localized in regions corresponding to large cell diameters and high complexity levels. Relatively to the other regions of the EV/SS plots, eosinophils might correspond to the area identified as 1 in the samples containing living cells.



**Fig. 2.** Hemocyte subpopulations are distinguished by flow cytometry analysis of crude hemolymph. About 1 mL of hemolymph was withdrawn from the posterior adductor muscle of a single mussel. A, density dot plot of cell electronic volume (EV), expressed as cell diameter ( $\mu\text{m}$ ), versus cell complexity side-scatter in log scale (SS). The cytometer was triggered on particle diameters exceeding  $5.5 \mu\text{m}$ . Events were gated according to region 4, in order to exclude large diameter particles from analysis. Overall excluded events corresponded to  $1.98 \pm 0.01\%$  ( $n = 3$ ) of the total. Three subpopulations of interest have been delimited by off-line analysis (numbered 1, 2 and 3). B, distribution of cell diameters in the sample. Cell diameters of the three subpopulations are superimposed in the corresponding colours. *Inset*, EV distribution of calibration  $10\text{-}\mu\text{m}$  latex microspheres. C, distribution of cell complexity in the sample. SS signals of the three subpopulations are superimposed in the corresponding colours. D, 2D graph plotting cell diameters versus SS, for each region as defined in A. Note the linear scale of EV and SS axes. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of 3 biological replicates. Numbers indicate the percentage  $\pm$  SEM of cells in each region. E, examples of density dot plots exhibiting only two distinct cell populations. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

The capability of the different mussel hemocyte subpopulations to phagocyte particles was evaluated by using an *in vitro* assay consisting in adding  $2\text{-}\mu\text{m}$  fluorescent microspheres, as potential phagocytic targets, in short term primocultures. Flow cytometry quantification of fluorescence permits to differentiate single from multiple phagocytosis events, at the single cell level (Fig. 4B, *inset*). As seen in Fig. 4B, ingestion of latex beads increases cellular complexity. In particular, hemocytes containing more than one microsphere were shifted to regions corresponding to higher SS values, by comparison to cells incorporating only one target. As

a consequence, a detailed distinction between phagocytic activities of subpopulations 1 and 2 cannot be reliably achieved. Clearly however, rare phagocytic cells in region 3 incorporated only one fluorescent bead and never more, whereas cells on regions 2 and 1 displayed mainly multiple phagocytic events. As recommended by Voccia et al. [35], positive (namely phagocytic) cells were defined as cells having incorporated three or more fluorescent beads. According to this criterion, phagocytic hemocytes were principally found in regions 1 and, to a less extent, in region 2. Quantitatively,  $0.15 \pm 0.05\%$  of cells in region 3 were positive for three and more



**Fig. 3.** Anti-aggregative Alsever's solution preserves hemocyte subpopulations characterized in crude hemolymph. About 500 µL of hemolymph were withdrawn from a single mussel by using a syringe containing 500 µL of anti-aggregative Alsever's solution (ALS). The cytometer was triggered on particle diameters exceeding 5.5 µm. Events were gated according to region 4, in order to exclude large diameter particles from analysis. Overall excluded events corresponded to  $1.24 \pm 0.01\%$  ( $n = 6$ ) of the total. A, representative dot plot revealing patterns of events distribution very similar to those obtained with crude hemolymph, with three characteristic clustered dot clouds (1, 2 and 3). The lower detection limit was set at 5.5 µm. B, C, distribution curves of cell diameters (B) and cell complexity (C), including the three subpopulations. The cell complexities are ordered as in Fig. 1. D, in 2D-graphs plotting cell diameters versus SS, subpopulations appeared equivalently represented. Cell diameters in ALS were slightly smaller compared to those in crude hemolymph. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of 6 biological replicates.

targets ( $n = 6$ ). Region 2 contained  $3.35 \pm 0.48\%$  of phagocytic cells and  $42.42 \pm 4.08\%$  of the hemocytes were positive for phagocytosis in region 1.

### 3.3. Actin microfilaments localization

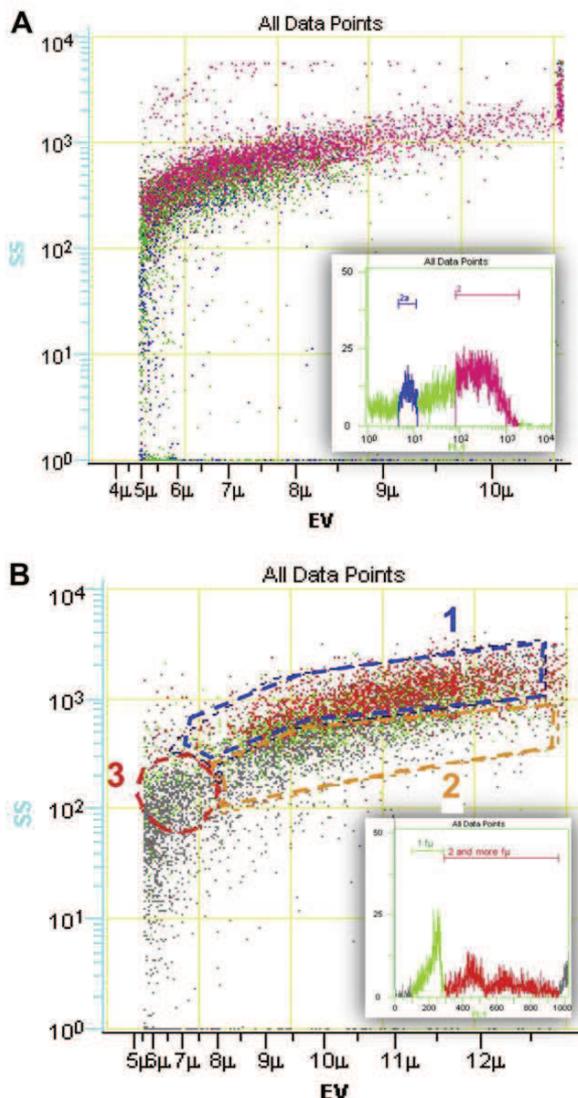
One major component determining the cell morphology is the structure of the actin microfilament cytoskeleton. Cell migration involves changes in the cell shape entailing local microfilament rearrangements, revealed by the formation of particular dynamic actin-rich structures. Herein, we have studied the organization of the actin cytoskeleton in fixed mussel hemocytes by using FITC-labelled phalloidin. Nuclei were stained with Hoechst 33342, in order to check the number of cells involved. Micrographs obtained in epifluorescence microscopy revealed the occurrence of a variety of actin localizations. In cells spread in anisotropic manner, large actin-containing peripheral regions corresponding to lamellipodia were easily identified (Fig. 5A). In some cells, these zones were recovered by thin undulating membrane veils characteristic of unstable membrane ruffles (Fig. 5A, lower cell). In addition, a network of very fine actin fibers, difficult to resolve in light microscopy, fills the perinuclear cytosol, excepted in several circular places which resemble to eosinophilic granules.

Conversely, in cells spread in an anisotropic manner, lamellipodia were not present. Instead, these cells exhibited protruding thick actin bundles analogous to filopodia. Spots similar to specialized focal adhesions called podosomes were also found in the cell body (Fig. 5B, upper cell). In structures formed by cell aggregation, actin bundles were prolonged into stress fibers oriented in parallel to the membrane outlines (Fig. 5B lower cell and Fig. 5D).

Basophils were recognized as small cells with a large number of fine and short filopodia irradiating from a tiny cell body (Fig. 5C, top cell). Basophils were also observed as close cell aggregates settling above spread cells, as revealed by localization of the nuclei (Fig. 5C, middle cells, 7 nuclei, lower cells, 4 nuclei) or adapted image processing (Fig. 5E).

### 3.4. Motility and fast deformability of hemocytes

Hoffman modulation contrast (HMC) microscopy produces an optical section, because of the reduced depth of field, and a pseudo three-dimensional effect that increases contrast, specifically in unstained living specimen enclosing optical phase gradients. In this respect, HMC is useful to enhance visibility of endomembrane systems and plasma membrane outlines. HMC micrographs and time-lapse sequences of different cell types found in mussel



**Fig. 4.** Identification of eosinophils and phagocytes subpopulations by flow cytometry. A, freshly collected hemocytes were fixed in methanol prior staining with eosin and analysis by flow cytometry in Marine Isodiluent as stealth fluid. The 488-nm laser line was used as excitation light. Eosin fluorescence of each particle was quantified via the FL1 channel (log scale) through a 525 nm band pass filter. Voltage setting of photomultiplier was set in order to obtain low and high fluorescence level events, corresponding to regions named 2a and 2 in the inset. Eosinophil cells are located in a region corresponding to complex cells. B, hemocytes were incubated for 30 min with 2  $\mu$ m fluorescent latex beads, at a concentration corresponding to 50 beads/cell. Inset, flow cytometry analysis allows identification of cells containing none (gray), one (green) or more (red) fluorescent microspheres (fu) which give corresponding quantified signals. Phagocytes were considered to be cells containing three or more fluorescent microspheres. Phagocytes are located in a region corresponding to complex large cells.

hemolymph are presented in Fig. 6 and in supporting video files. Unambiguous identification of hemocyte subpopulations as classified according to Hemacolor staining is not possible under HMC. However, a potential identification is proposed on the base of cell sizes and intracellular structures. Fig. 6A left and supporting video 1 show cells that retain some key characteristics of eosinophilic granulocytes. They are large spread cells with a mass of small perinuclear granules. Fig. 6A middle and supporting video 2 show tiny cells exhibiting features of basophils, with a high

nucleus/cytoplasm ratio and small shaggy filopodia. Fig. 6A right and supporting video 3 show large cells related to hyalinocytes, characterized by a flat spread cell body, some rare granules or large phagosome-like vacuoles. In these experiments, time-lapse recordings revealed that all hemocytes, i.e. each cell type, are motile cells, exhibiting remarkable membrane plasticity and inner rearrangement of organelles, within minutes.

Dynamic microscopy also allows to differentiate mussel hemolymph cell types on the basis of their motion. As seen on the supporting video 4, eosinophil-like cells are characterized by amoeboid movements. Basophil-like hemocytes utilized small lamellipodia to glide and thick filopodia as towing arms (see also supporting video 2). In addition, hemocyte–hemocyte interactions are also more obvious because the contribution of each cell to the interaction is seen over time. In this respect, supporting video 5 shows a basophil-like in close proximity of a spread cell and supporting video 6 shows rapid movements of a basophil-like settling on a spread cell. Supporting video 7 describes the motility of a small aggregate of 3 basophils and supporting video 8 illustrates the dissociation of a large circular aggregate.

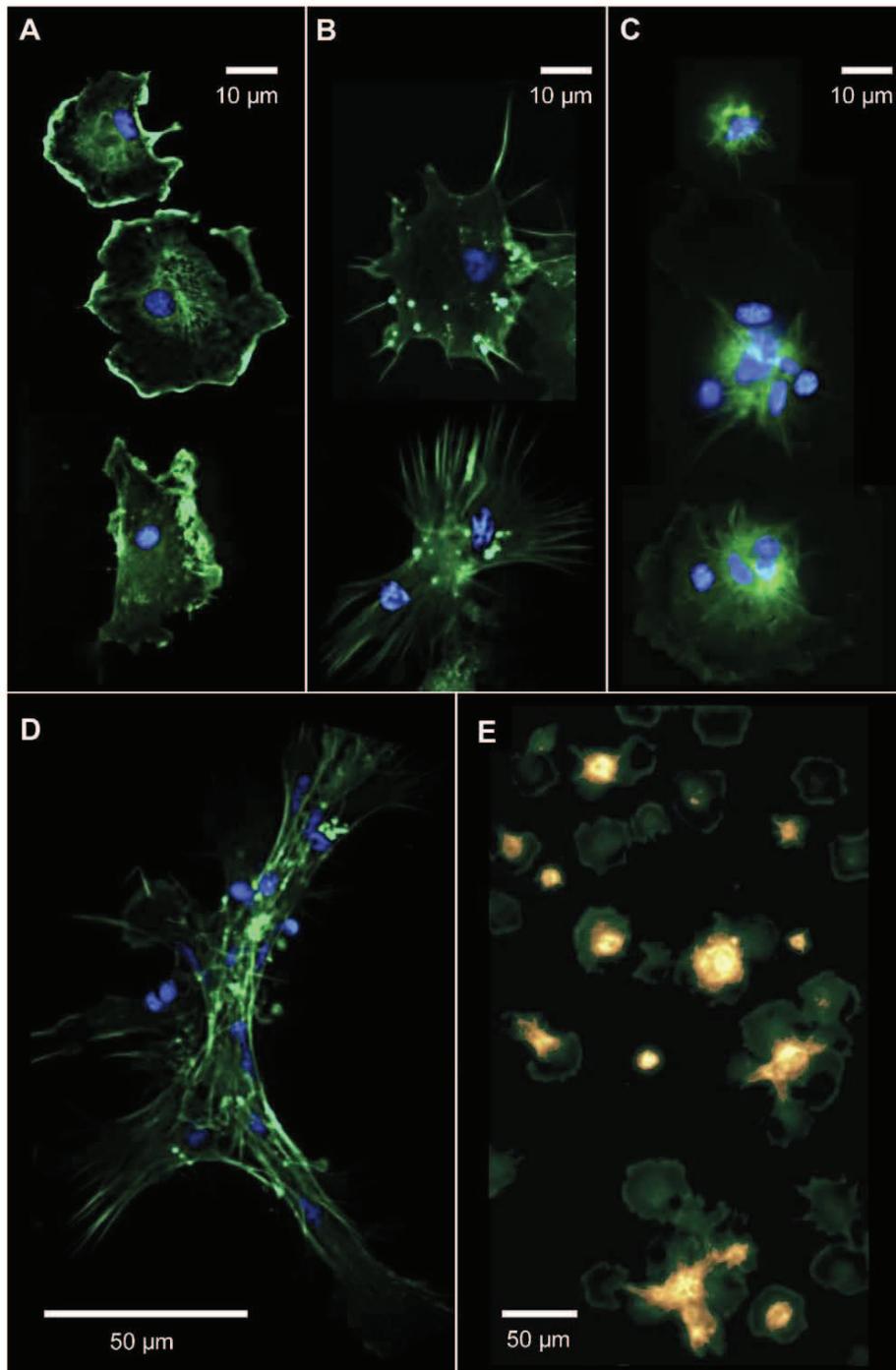
Time-lapse recordings, however, also revealed the outstanding deformability of hemocytes. In short dynamic microscopy sequences (30 min) it appears that initially spread cells experienced episodes of dramatic shrinking in a short delay, typically below 1 min (Fig. 6B1 & corresponding supporting video 9; Fig. 6B2). Conversely, in some cases, cells displaying a condensed body at the beginning of recordings were able to spread very rapidly as depicted in Fig. 6B2, 6B3 and corresponding supporting video 10 and 11. Fig. 6B4 illustrates the motion sequence of a basophil-like hemocyte.

To identify definitively hemocyte cell subpopulations under HMC videomicroscopy, Hemacolor staining was carried out, in some sequences, immediately after recording. Eosinophils, basophils and hyalinocytes were marked on the Hemacolor micrograph and subsequently located on the last image of the time-lapse sequence. All the corresponding cells were tracked over reverse time-lapse playing and outlined on the first image of the sequence. A representative result is shown Fig. 7, from a 20-min sequence. All cell types identified after Hemacolor staining were detected as motile cells during the recordings. Isolated basophils were rare, while aggregates of several basophilic cells were more frequent. These cells displayed a non-amoeboid motion type, with very short periods of moderate spreading. Conversely, eosinophils and hyalinocytes were mostly observed as isolated spread cells, moving slowly with amoeboid shape changes, most of the time. However, these spread cells were capable of sudden fast shrinking events.

### 3.5. Motility characteristics during a spreading/shrinking sequence

Hyalinocytes and eosinophils morphologies are characterized by alternating spread and condensed phases. To correlate cell velocimetric features (trajectory and velocity) and shape changes, a dedicated analysis program has been developed. First, as described in the Material and Methods section, for each analysis, a cell of interest was selected by visual inspection of recordings. The cell margins were outlined. The analysis program computed the radius from the centroid to the outer limit of the cell in each distinct image of the sequence. All analysis were stacked in a 3-D-map which was colour-coded in a synthetic chart, called morphogram. A morphogram gives a graphic representation of membrane expansion (colours) over 360 degrees (Y axis) as a function of time (X axis) for a single cell (Fig. 8).

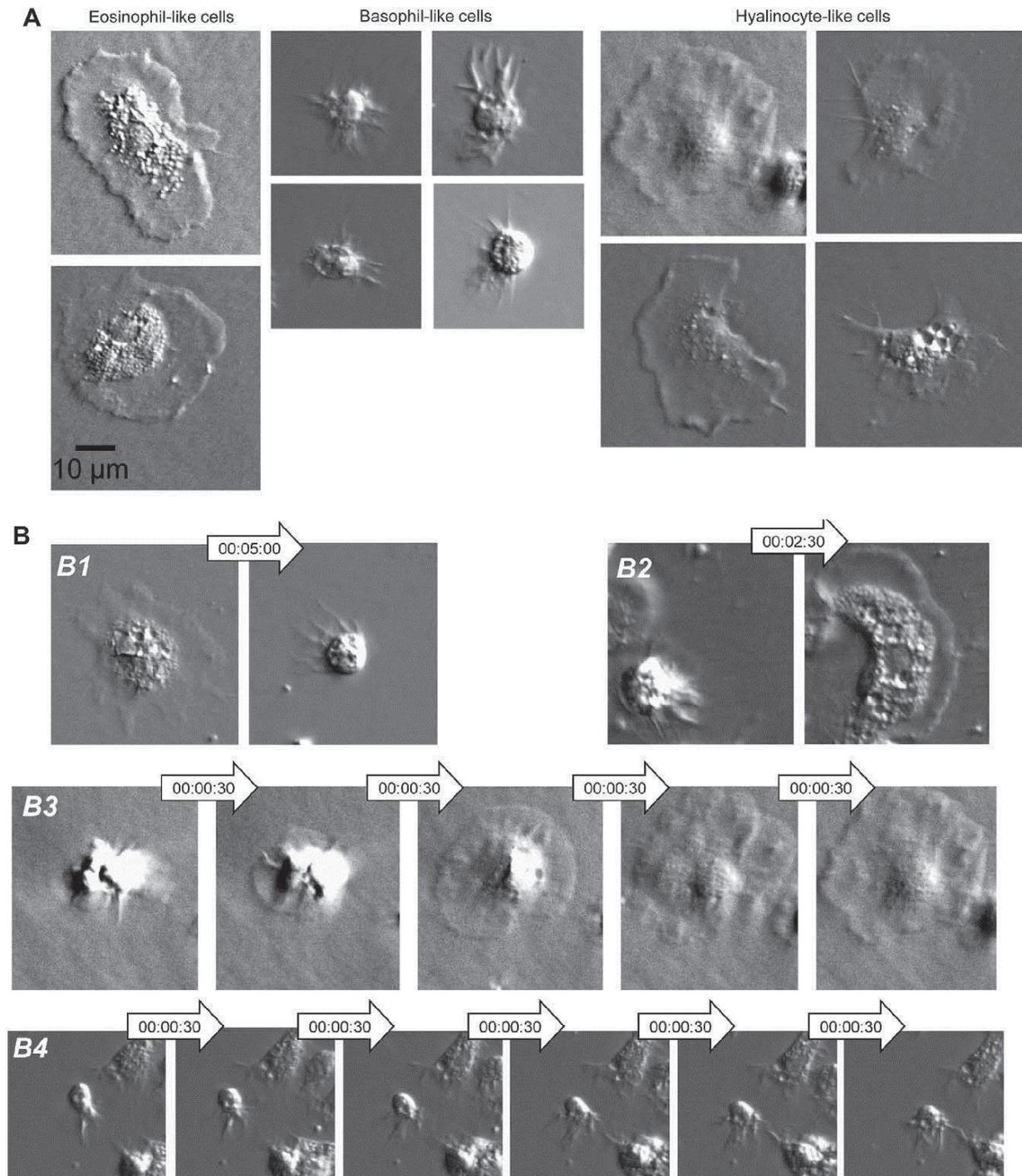
In morphograms of Fig. 9A, obtained from eosinophil-like cells, periods of cell retraction appear in blue and periods of membrane expansions are represented in red. During the spreading phases,



**Fig. 5.** Epifluorescence images of actine cytoskeleton in hemocytes. Actin microfilaments were stained with phalloidin-FITC (green) and nuclei with Hoechst 33342 (blue). A, in spread cells, actin has a peripheral localization, with thickenings corresponding to membrane ruffles. Actin is also seen around the nucleus with hollowed materials that may correspond to granules. B, some cells display relatively homogen cytoplasmic actin, with some marked spots (podosomes), and relatively coarse filopodia containing actin bundles. C, isolated basophils are identified as small cells with numerous filopodia extending out from a condensed cell body, as an irradiating star (top image). Very often, basophils form cell clusters settling on eosinophils. Such interactions are underlined by close nucleus associations (middle and bottom images). D, in this non circular aggregate, many cells (at least 15) having coarse actin bundles and sometimes elongated nucleus, interact. E, this image has been processed in false colours to represent eosinophil basement in dark green and top basophils in light orange. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

hemocytes often adopted a marked anisotropic shape consisting in membrane expansions separated by angles of 180 degrees (Fig. 9A1 & 9A2). Thus, spread eosinophils spent significant time with an anisotropic bipolar morphology. The velocimetric parameters

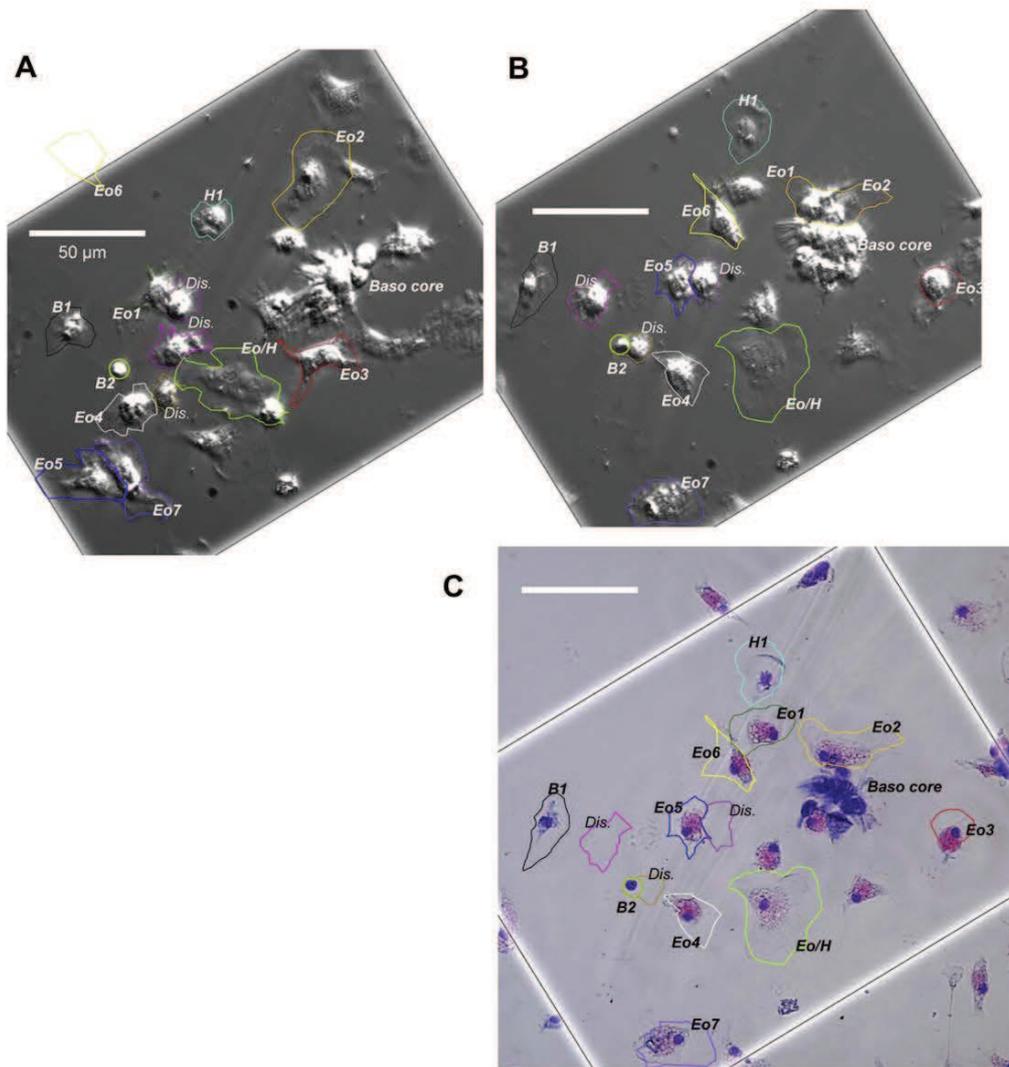
corresponding to the cell of Fig. 9A are presented in Fig. 9B. The corresponding time-lapse sequence is given in the supporting video 12. Two major phases of motion were distinguished. Periods of cell retraction corresponded to displacements at high velocity



**Fig. 6.** Hoffman modulation contrast images of *Mytilus edulis* hemocytes. A, pseudo three-dimensional images of hemocytes, obtained by Hoffman modulation contrast, enhancing visibility of plasma membrane and granular/vacuolar endomembrane systems margins. Characteristics of eosinophils (small perinuclear granules, left), basophils (tiny-condensed cytoplasm with some granules and peripheric filopodia, center) and hyalinocytes (large cells with few granules or large vacuoles, right) can be easily distinguished. B, time-lapse imaging of cells maintained in MPSS. Dynamic microscopy was performed for periods of 0.5–14 h, at the rate of 1 image every 30 s. The micrographs of cells, selected from various regions of different primary cultures, are separated by time intervals as indicated in arrows on the top of the images (hours:minutes:seconds). Note the very fast shape changes, within seconds in some cases. Interconversions of large spread cells into small basophil-like hemocytes are often observed, as depicted in fig B1, B2 & B3. Consult online additional video for a dynamic visualisation of hemocyte plasticity.

(about  $30 \mu\text{m min}^{-1}$ ) with reduced modifications of the angle of motion. The cell exhibited a non-amoeboid filopodia-based motility type. Conversely, periods of cell spreading were related to a lower velocity (about  $5 \mu\text{m min}^{-1}$ ) with constant variations of

direction. During these phases, the cell under study displayed amoeboid movements. The mean velocity of eosinophil-like cells measured in distinct biological replicates was  $10.6 \pm 1.4 \mu\text{m min}^{-1}$  ( $n = 20$ ).



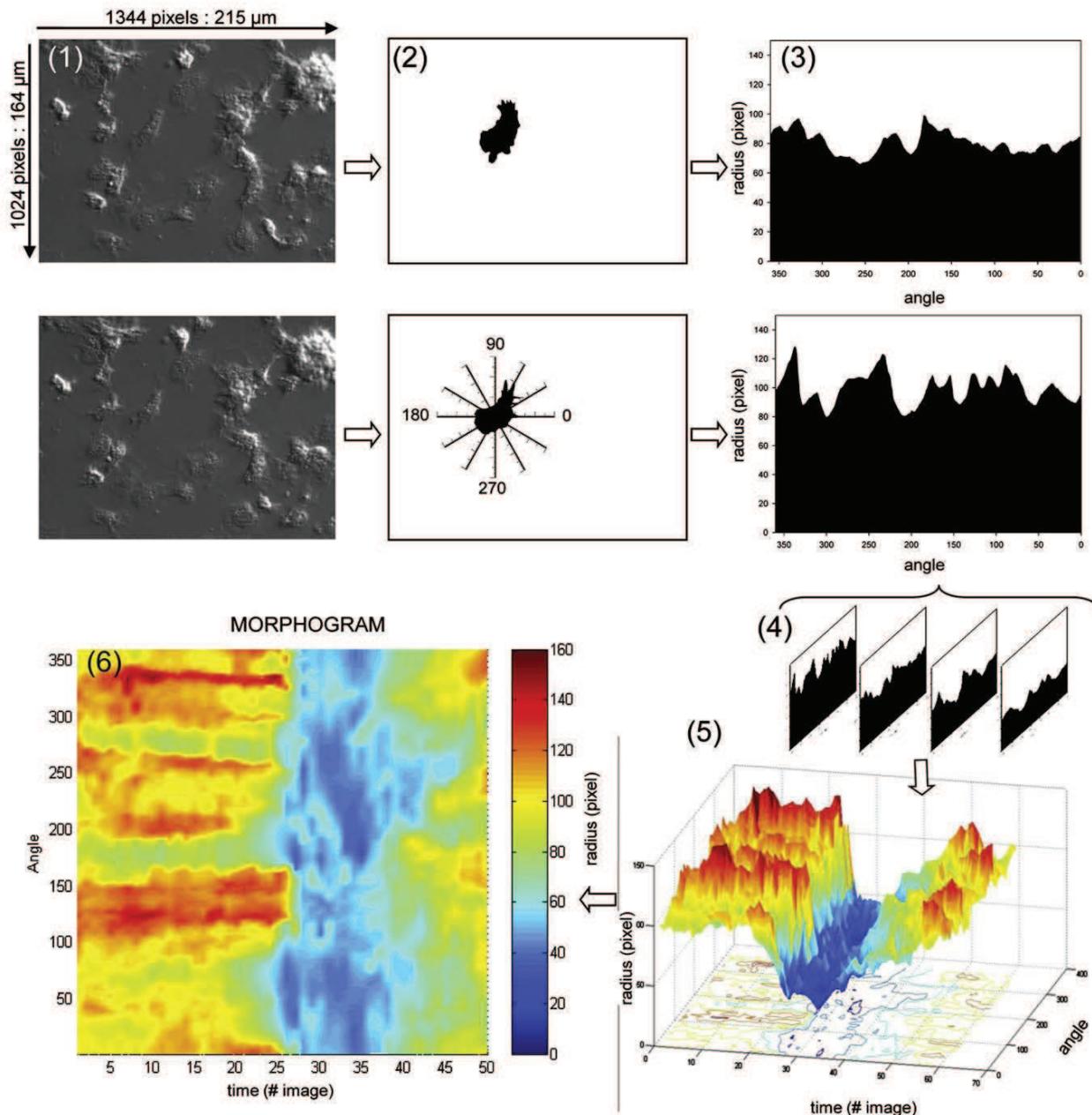
**Fig. 7.** Hemacolor identification of cell types after time-lapse recording. **A**, this picture corresponds to the first image of a 20-minutes time-lapse sequence, recorded at the rate of 1 image every 30 s **B**, this picture corresponds to the last image of the sequence. **C**, micrograph of the same microscopic field view in **B**, after Hemacolor staining. The region of interest, corresponding to the field of time-lapse imaging, has been delineated by a frame box. In **A** & **B**, cell edges have been emphasized by solid lines during off-line analysis. The cells outer limits determined in **B** are superimposed to the Hemacolor staining in **C**. Cells are identified as *Eo* for eosinophils, *B* for basophils, *H* for hyalinocytes and *Dis.* for cells that have disappeared after Hemacolor treatment. A basophilic aggregate is designated as “*Baso core*”. Identified cells in **B** were tracked over reverse time-lapse playing and labelled according to their initial shape and position in the image **A**.

#### 4. Discussion

Over the past decade, the immune response of bivalves has been extensively explored under various conditions of modulation and at different levels of organization. In *Mytilus* sp., at the molecular level, detailed information concerning the role of “classical” signalling pathways in hemocytes are now available [36–39]. At the cellular level, a great number of studies, involving living hemocytes exposed *in vitro* to different substances or microorganisms, have investigated a variety of cell functions such as phagocytosis [12,13,28,40,41], production of reactive oxygen or nitrogen species [9,40,42–44], multi-xenobiotic resistance [45] or lysosomal activity [39,46]. These functions have also been used to assess the status of the whole immune system, at the integrated level, in animals injected with bacteria [29,31], or exposed to pollutants in the laboratory [47,48] as well as in contaminated sites [49,50]. In these studies, hemocytes are generally considered as a single set of cells.

However, several subpopulations have been described in mussels, mainly on the basis of morphological differences from microscopic observation of spread cells [24–26] or, more recently, from flow cytometry analysis of dispersed cell suspensions [28,29,38]. Nevertheless, mussel hemocyte classification is still a matter of debate. In fact, the absence of available molecular cell marker together with the apparent multiplicity of cell shapes in microscopic preparations render classification controversial. In the present work, we have introduced an additional parameter, the time, in the study of the morphologies of living hemocytes in order to contribute to their identification and to a better understanding of their functions.

After staining with Hemacolor, different subpopulations were identified according to their inner structures. Granular cells were eosinophils. In these cells, red-stained granules were always abundant and occupied an important volume. Lucent vesicles likely corresponding to early phagosomes [51] were observed. When

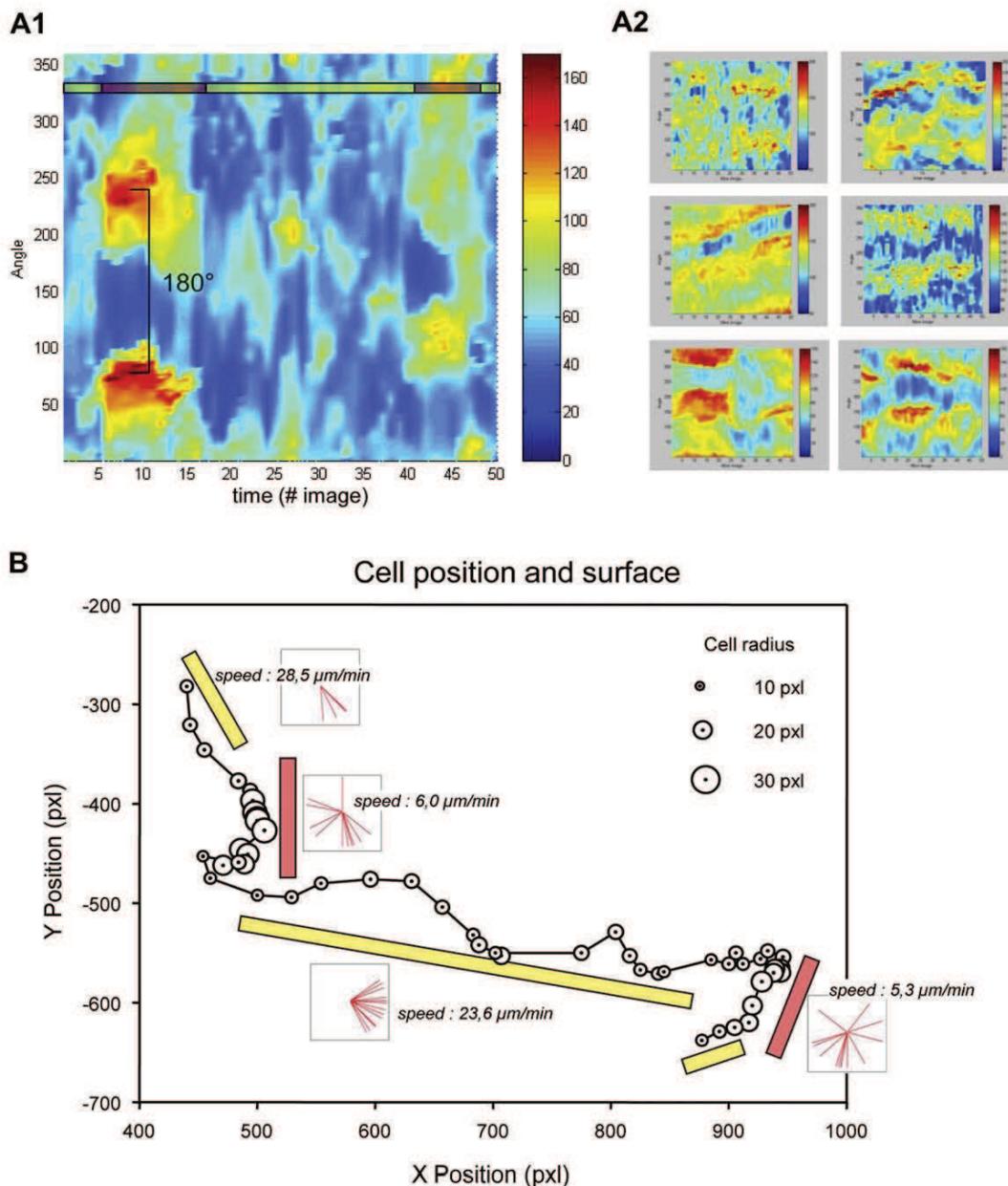


**Fig. 8.** Assessment of hemocyte fast deformability and membrane edges extensions *via* morphogram maps. This figure describes the different steps required to build a morphogram from a time-lapse sequence of images. The first step is to find a single cell of interest within the sequence (1). The cell outline is manually delineated, image after image, and converted into 1 bit bitmap (2). Then, a homemade Matlab program changes the Cartesian coordinates of each pixel forming the cell membrane margin into a polar coordinate system, where the origin is the centroid of the cell, the radius  $r$  corresponds to the membrane extension (in pixels) and the polar angle  $\theta$  is the counter clockwise angle from the  $x$ -axis (in degrees, 3). All cell membrane extension profiles are then stacked (4) to build a 3-D map expressing the cell radius at each angle versus time (5). The extension radius is finally colour-coded to produce a 2-D map, termed morphogram (6). A morphogram depicts cell shape changes during a whole time-lapse sequence in a single synoptic chart.

spread on substrate, eosinophils encompassed a relatively large area. In good agreement with our results eosinophilic granulocytes have been described in mussels [24] and [26]. Granulocytes have also been described in other works [25,28], but without information concerning the precise nature, acidophilic or not, of the granules.

By contrast, basophils covered a tiny surface. Their cytoplasm displays a characteristic dove-blue coloration. Short and thick filopodia-like membrane protrusions were observed. Few small

and dark granules were frequently present in basophilic cells. Isolated basophils were relatively difficult to observed, as these cells frequently formed unresolved aggregates or, at least, settled on other spread cells. Hyalinocytes differed from eosinophils and basophils mainly by the absence of coloured granules and of clear-cut cytoplasm staining. However, a very pale red or blue cytosolic coloration could occasionally be perceived. Their spread surface was often superior to the area occupied by eosinophils. Early phagosome-like vesicles were not rare. Whereas



**Fig. 9.** Representative motion sequence of a mussel hemocyte analyzed by morphogram and cell tracking. A volume of 100  $\mu\text{L}$  of freshly collected hemolymph was plated on a 35-mm culture dish and covered with 2 mL of MPSS. Several time-lapse recordings were carried out on different microscopic fields. A1, morphogram analysis of a representative cell, selected for its successive phases of shape changes, followed over 25 min. The sequence is characterized by two main periods of cell spreading, centred on images numbered 10 and 44, separated by phases of cell surface shrinkage. During the periods of spreading, the cell adopted a clear-cut bipolar shape revealed by membrane extensions spaced 180 degrees apart. A2, collection of morphograms obtained from different time-lapse recordings and analysis. Shrinkage and spreading phases alternated. During spreading phases, anisotropic bipolar cell shapes were frequent. B, correlation between cell shape and motility by velocimetry analysis. The XY cell position was plotted throughout the time-lapse sequence, by using a circular symbol varying in size as a function of the cell surface. The instantaneous speeds and angles of motion are indicated in boxes superimposed to the trajectory. Phases of high speed narrow-oriented displacements associated to a reduced cell surface (yellow bars) alternate with phases of low speed movements, while the cell occupies a large area and constantly modifies its route (red bars).

phagosome-containing cells did not exhibit a totally unfilled hyaline cytosol *per se*, they were nevertheless considered as hyalinocytes, as already reported in the carpet shell clam [52]. Thus, obviously, hyalinocytes constitute the most heterogeneous subpopulation. While basophils and hyalinocytes are clearly described in the literature, their designation appears somewhat confusing. According to [26] for example, hyalinocytes are smaller than granulocytes and some of them contain small basophilic

granules. Herein, the corresponding cells were called basophils. In fact, depending on the relative priority given by the authors to the coloration or the abundance of granules, equivalent cells are apparently designed as hyalinocytes or basophils. In the present work, we decided to follow the guidelines of the Hemacolor manufacturer and to give priority to the cell staining.

In previous works, mussel hemocyte subpopulation analysis by flow cytometry determined dissimilar numbers of distinct

subpopulations, *i.e.* two [38], three [29] or four [28]. In this work, we separated at most three well-defined subtypes according to the EV/SS criteria. Eosin fluorescence quantification in fixed cells suggested that cells in region 1 were eosinophilic granulocytes. This is consistent with the high cellular complexity of these cells that contain many granules, as seen in Hemacolor preparations and HMC microscopy. This region also comprised the cells exhibiting by far the highest phagocytic activity. Region 1 probably corresponds to large granular cells named R1 by Garcia-Garcia et al. [28] and qualified as “professional” phagocytes.

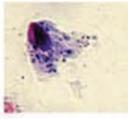
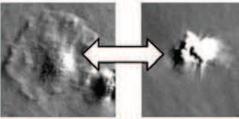
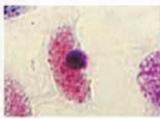
The smallest cells were segregated in region 3 of the EV/SS dot plots. In this region, mean diameters of cells in suspension ranged between 7 and 7.5  $\mu\text{m}$  in crude hemolymph or in ALS, as well. The smallest cells observed after fixation or under HMC microscopy were basophils and were of corresponding diameters. Time-lapse recordings highly suggested that basophils did not spread significantly and thus, were of similar size in mono-layers or suspended in the analysis chamber of the flow cytometer. For these reasons, region 3 most likely corresponded to basophils.

Finally, the most heterogeneous hemocyte subpopulation was related to hyalinocytes. Time-lapse recordings proved that these cells are capable of spreading and also of remarkable shrinkage. In suspension in the cytometer, hyalinocytes were probably under this latter constricted geometry. Hence, these cells should also be segregated in the region 3 of the cytometry profile, since hyalinocytes are non-complex cells. That was certainly the case in some of our hemolymph samples, when only two hemocyte subpopulations were separated. As a consequence, in our experimental conditions, region 3 matches to small semigranular (basophils) and agranular

(true hyalinocytes) cells named respectively R3 and R4 by Garcia-Garcia et al. [28]. By contrast, in other mussels, hyalinocytes apparently exhibited an increased cell volume, probably caused by the presence of phagosomes, and were separated in region 2, containing less complex cells but with similar diameters than eosinophils and corresponding to large semigranular cells named R2 by Garcia-Garcia et al. [28]. We can thus assume that, according to the physiologic state of the immune system, flows of hyalinocytes probably depopulate or repopulate regions 1 and 2 of EV/SS dot plots. This point requires however further investigations.

In addition to cytochemistry and cytometry, hemocyte subpopulations were distinguished here by the type of motility and hemocyte–hemocyte interactions. Membrane deformations of basophils were basically characterized by the presence of numerous protruding filopodia undulating from a condensed cell body. Basophils maintained a relative spherical morphology. Because of the reduced part of the cell confined within the focal plan of the HMC optics and the difficulty to outline their fine filopodia, morphogram analysis of basophils was not carried out. However, the structure of the cytoskeleton as well as the examination of time-lapse recordings gave details on membrane dynamics of basophils. In cells labelled with FITC-conjugated phalloidin, a dense actin network organized radially within a small cell body differentiated basophils from spread cells exhibiting a peripheral actin repartition. Such differences in the organization of actin cytoskeleton within subtypes of mussel hemocytes have already been reported [44]. Using these filopodia as paddles, basophils row and glide on substrate. Flattened membrane lamella expansions were limited to the nucleus proximity. This mode of cell

**Table 1**  
Proposed overview table of mussel hemocyte subpopulations.

cell type	Approx. %	size <sup>a</sup> ( $\mu\text{m}$ )	granules <sup>b</sup>	Phagocytic capability <sup>c</sup>	Region <sup>d</sup>	Hemacolor appearance	HMC <sup>e</sup> appearance and types of motility	Notes
Sometimes regrouped as hyalinocytes*	basophils	20–25 %	7	Semi-granular basic	No	3	 Filopodia-based	Constitute the core of aggregates  Not always well separated in flow cytometry
	hyalinocytes	5–45 %	10	No granules phagosomes	Low	2	 Amoeboid Filopodia-based	
eosinophilic granulocytes	35–65 %	10	Acidic granules phagosomes	High	1	 Amoeboid Filopodia-based	"Professional" phagocytes	

<sup>a</sup>Size corresponds to diameters computed from the electronic volume signals of cells in suspension in crude hemolymph and analysed by flow cytometry in Marine Isodiluent as stealth fluid.

<sup>b</sup>Granules refers to coloration of intracellular granulations after Hemacolor staining.

<sup>c</sup>Capability to phagocyte three or more 2  $\mu\text{m}$  fluorescent microspheres.

<sup>d</sup>Numbers corresponding to the regions delimited in flow cytometry EV/SS density dot plots.

<sup>e</sup>HMC : Hoffman modulation contrast. For hyalinocytes and eosinophils, a spread and a condensed form of the same cell are shown. Changes in morphology are indicated by directional hollowed arrows.

\*Some authors consider only two types of mussel hemocytes ; in some samples, only two populations can be distinguished in flow cytometry EV/SS dot-plots.

Black arrows indicate probable drifts of hyalinocyte subpopulations as a function of cell complexity, with a few (solid line) or a great number (dashed line) of phagosomes.

motion is not common and resembles to the non-amoeboid locomotion of microglia obtained from newborn rats [53]. The second striking feature of basophils was their ability to settle on spread cells. This situation makes them sometimes difficult to distinguish. However, actin cytoskeleton imaging associated to nuclei counterstaining permitted the reliable detection of small basophils located on top of spread cells. Moreover, in time-lapse recordings, basophils were revealed by the typical movements of filopodia superimposed to the membrane of the basement cell. Basophils not only interacted with spread cells, but also with other basophils to form basophilic cores of different sizes. These structures appeared to be dynamic but remained stable for relatively long periods. Basophilic aggregates were apparently not able to migrate. Basophilic cores systematically constituted the center of hemocyte aggregates. Among these lines, it should be mentioned that, so far, the physiologic significance of the aggregative properties of basophils is not documented. However, the occurrence of such frequent cell to cell contacts highly suggests the existence of functional interactions between mussel hemocytes.

Spread cells, *i.e.* eosinophil-like and hyalinocyte-like hemocytes as seen under HMC microscopy, displayed both similar motion patterns, marked by noticeable transitions between spread and shrunk cell morphologies. Morphogram analysis conclusively discriminated periods of slow amoeboid motion, often characterized by a bipolar shape of large area, from faster filopodia-based displacements. Shape transitions probably corresponded to an important re-organization of the membrane tangentially-oriented actin cytoskeleton towards protruding actin bundles, associated to stress fibers and podosomes, as seen in FITC-plalloidin labelled cells.

From the previous observations reported in the literature and the present work, we propose a morphofunctional classification of mussel hemocytes, including their motile properties (Table 1). This synthetic view of mussel hemocyte subpopulations has to be confirmed by future works.

## 5. Conclusion

All together, the present data bring new insight into the motility of mussel hemocytes. The study of hemocyte movements at the single cell level provides novel criteria that help to classify the different subpopulations. The ability of these cells to rapidly modify their morphology highly recommends to rule out any cell type identification simply based on morphology from fixed hemocyte preparations or snapshots of living cells. As discussed by Garcia-Garcia et al. [28], an urgent effort should be done to propose consensual criteria for hemocyte classification. The classical view discerns granulocytes from hyalinocytes. According to their motility and interaction patterns, an alternative distinction could be proposed, distinguishing basophils from spread hemocytes. Investigations including time-lapse motility imaging on living cells physically sorted by flow cytometry should now be carried out to further characterize mussel hemocyte subpopulations.

The results reported here have also some physiological implications. In the open circulatory system of bivalves, the absence of endothelial sheath probably facilitates hemocyte tissue infiltration [2]. The balance between hemolymph-circulating and tissue-resident hemocytes has been reported to account for the seasonal variations in total hemocyte counts [54] or to be indicative of the pathophysiological state of animals injected with LPS [21]. A better understanding of hemocyte motility could therefore provide precious information concerning the efficacy of immune defence and guidelines for reliable interpretation of hemocyte counts. In molluscs, little is known on the mechanisms involved in hemocyte motility regulation. However, data exist in

other invertebrates. Chemotactic phenomena have been, for instance, described in shrimp hemocytes [32]. In insects, hemocyte spreading and activation is mediated by a 23 amino-acid plasma-cytocyte spreading peptide isolated from hemolymph [55,56]. Further studies are necessary to investigate whether such mechanisms do exist in mussels.

Velocity alterations of a motile human macrophage cell line have been used to evaluate toxicity of atmospheric pollutants [57]. Likewise, potential modifications of mussel hemocyte motility might constitute a valuable tool for marine ecotoxicology. At least, monitoring of cell motion represents an excellent indicator of cell viability, in addition to common biochemical approach such as MTT assays [45], for immunotoxicity assessment by *in vitro* exposure of hemocytes.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the State/Region Plan Contract (CPER) allocated through the Research Federation FED 4116 SCALE (Sciences Appliquées à L'Environnement). Damien Rioult and Jennifer Pasquier were recipients for doctoral fellowships from the Conseil Regional de Haute-Normandie. The authors are indebted to Ludovic Petit for his valuable technical assistance.

## Appendix. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.fsi.2009.11.011.

## References

- [1] Munoz-Chapuli R, Carmona R, Guadix JA, Macias D, Perez-Pomares JM. The origin of the endothelial cells: an evo-devo approach for the invertebrate/vertebrate transition of the circulatory system. *Evol Dev* 2005;7(4):351–8.
- [2] Shigei T, Tsuru H, Ishikawa N, Yoshioka K. Absence of endothelium in vertebrate blood vessels: significance of endothelium and sympathetic nerve/medial smooth muscle in the vertebrate vascular system. *Jpn J Pharmacol* 2001;87(4):253–60.
- [3] Rowley AF, Powell A. Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific? *J Immunol* 2007;179(11):7209–14.
- [4] Iwanaga S, Lee BL. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol* 2005;38(2):128–50.
- [5] Tincu JA, Taylor SW. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(10):3645–54.
- [6] Pallavicini A, Del Mar Costa M, Gestal C, Dreos R, Figueras A, Venier P, et al. High sequence variability of myticin transcripts in hemocytes of immune-stimulated mussels suggests ancient host-pathogen interactions. *Dev Comp Immunol* 2008;32(3):213–26.
- [7] Winston GW, Moore MN, Kirchin MA, Soverchia C. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, *Mytilus edulis*: lysosomal localization and effect of xenobiotics. *Comp Biochem Physiol C, Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1996;113(2):221–9.
- [8] Gourdon I, Guerin MC, Torrelles J, Roch P. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide* 2001;5(1):1–6.
- [9] Novas A, Cao A, Barcia R, Ramos-Martinez JL. Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(3):390–4.
- [10] Novas A, Barcia R, Ramos-Martinez JL. Nitric oxide production by haemocytes from *Mytilus galloprovincialis* shows seasonal variations. *Fish Shellfish Immunol* 2007;23(4):886–91.
- [11] Thomas-Guyon H, Gagnaire B, Bado-Nilles A, Bouilly K, Lapegue S, Renault T. Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Dev Comp Immunol* 2009;33(5):653–9.
- [12] Carballal MJ, Lopez C, Azevedo C, Villalba A. *In vitro* study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 1997;7(6):403–16.
- [13] Malagoli D, Casarini L, Ottaviani E. Effects of the marine toxins okadaic acid and palytoxin on mussel phagocytosis. *Fish Shellfish Immunol* 2008;24(2):180–6.
- [14] Nabi IR. The polarization of the motile cell. *J Cell Sci* 1999;112(12):1803–11.
- [15] Bereiter-Hahn J. Mechanics of crawling cells. *Med Eng Phys* 2005;27(9):743–53.
- [16] Davies PS, Partridge T. Limpet haemocytes. I. Studies on aggregation and spike formation. *J Cell Sci* 1972;11(3):757–69.

- [17] Jones GE, Gillett R, Partridge T. Rapid modification of the morphology of cell contact sites during the aggregation of limpet haemocytes. *J Cell Sci* 1976;22(1):21–33.
- [18] Partridge T, Davies PS. Limpet haemocytes. II. The role of spikes in locomotion and spreading. *J Cell Sci* 1974;14(2):319–30.
- [19] Stefano GB, Leung MK, Zhao XH, Scharrer B. Evidence for the involvement of opioid neuropeptides in the adherence and migration of immunocompetent invertebrate hemocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(2):626–30.
- [20] Stefano GB, Cadet P, Scharrer B. Stimulatory effects of opioid neuropeptides on locomotory activity and conformational changes in invertebrate and human immunocytes: evidence for a subtype of delta receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(16):6307–11.
- [21] Hughes Jr TK, Smith EM, Barnett JA, Charles R, Stefano GB. Lipopolysaccharide and opioids activate distinct populations of *Mytilus edulis* immunocytes. *Cell Tissue Res* 1991;264(2):317–20.
- [22] Magazine HI, Liu Y, Bilfinger TV, Fricchione GL, Stefano GB. Morphine-induced conformational changes in human monocytes, granulocytes, and endothelial cells and in invertebrate immunocytes and microglia are mediated by nitric oxide. *J Immunol* 1996;156(12):4845–50.
- [23] Ottaviani E, Franchini A, Malagoli D, Genedani S. Immunomodulation by recombinant human interleukin-8 and its signal transduction pathways in invertebrate hemocytes. *Cell Mol Life Sci* 2000;57(3):506–13.
- [24] Moore MN, Lowe DM. The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles. *J Invertebr Pathol* 1977;29(1):18–30.
- [25] Cajaraville MP, Pal SG. Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment. *Cell Struct Funct* 1995;20(5):355–67.
- [26] Carballal MJ, Lopez C, Azevedo C, Villalba A. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis Aquat Organ* 1997;29:127–35.
- [27] Pipe RK, Farley SR, Coles JA. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res* 1997;289(3):537–45.
- [28] Garcia-Garcia E, Prado-Alvarez M, Novoa B, Figueras A, Rosales C. Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families. *Dev Comp Immunol* 2008;32(6):637–53.
- [29] Parisi MG, Li H, Jouvét LB, Dyrzynda EA, Parrinello N, Cammarata M, et al. Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria. *Fish Shellfish Immunol* 2008;25(6):834–40.
- [30] Allam B, Ashton-Alcox KA, Ford SE. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol* 2002;13(2):141–58.
- [31] Hernroth B. Factors influencing bactericidal activity of blue mussel (*Mytilus edulis*) haemocytes against *Salmonella typhimurium*. *Fish Shellfish Immunol* 2003;14(2):93–104.
- [32] Yip EC, Wong YH, Wong JT. Bacterial formyl peptide mediated chemotaxis and extracellular acidification in shrimp haemocytes. *Dev Comp Immunol* 2001;25(4):269–77.
- [33] Espinosa L, Paret L, Ojeda C, Tourneur Y, Delmas PD, Chenu C. Osteoclast spreading kinetics are correlated with an oscillatory activation of a calcium-dependent potassium current. *J Cell Sci* 2002;115(19):3837–48.
- [34] Dubin-Thaler BJ, Giannone G, Dobreiner HG, Sheetz MP. Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and STEPs. *Biophys J* 2004;86(3):1794–806.
- [35] Voccia I, Krzysztyniak K, Dunier M, Flipo D, Fournier M. In vitro mercury-related cytotoxicity and functional impairment of the immune cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 1994;29(1–2):37–48.
- [36] Asokan R, Arumugam M, Mullainadhan P. Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. *Dev Comp Immunol* 1997;21(1):1–12.
- [37] Canesi L, Betti M, Ciacci C, Scarpato A, Citterio B, Pruzzo C, et al. Signaling pathways involved in the physiological response of mussel hemocytes to bacterial challenge: the role of stress-activated p38 MAP kinases. *Dev Comp Immunol* 2002;26(4):325–34.
- [38] Cao A, Mercado L, Ramos-Martinez JI, Barcia R. Primary cultures of hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* Lmk.: expression of IL-2R[alpha] subunit. *Aquaculture* 2003;216(1–4):1–8.
- [39] Betti M, Ciacci C, Lorusso LC, Canonico B, Falcioni T, Gallo G, et al. Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on *Mytilus haemocytes* role of stress-activated mitogen-activated protein kinases (MAPKs). *Biol Cell* 2006;98(4):233–44.
- [40] Arumugam M, Romestand B, Torrelles J, Roch P. *In vitro* production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *Eur J Cell Biol* 2000;79(7):513–9.
- [41] Malagoli D, Casarini L, Sacchi S, Ottaviani E. Stress and immune response in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish Shellfish Immunol* 2007;23(1):171–7.
- [42] Torrelles J, Guerin M-C. Production of peroxynitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes in vitro. *Fish Shellfish Immunol* 1999;9(7):509–18.
- [43] Novas A, Barcia R, Ramos-Martinez JI. After the Prestige oil spill modifications in NO production and other parameters related to the immune response were detected in hemocytes of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 2007;85(4):285–90.
- [44] Gomez-Mendikute A, Etxeberría A, Olabarrieta I, Cajaraville MP. Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo(a)pyrene. *Mar Environ Res* 2002;54(3–5):431–6.
- [45] Marin M, Legros H, Poret A, Leboulenger F, Le Foll F. Cell responses to xenobiotics: comparison of MCF7 multi-drug- and mussel blood cell multi-xenobiotic-defense mechanisms. *Mar Environ Res* 2004;58(2–5):209–13.
- [46] Canesi L, Ciacci C, Betti M, Scarpato A, Citterio B, Pruzzo C, et al. Effects of PCB congeners on the immune function of *Mytilus* hemocytes: alterations of tyrosine kinase-mediated cell signaling. *Aquat Toxicol* 2003;63(3):293–306.
- [47] Duchemin MB, Auffret M, Wessel N, Fortier M, Morin Y, Pellerin J, et al. Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through *in vivo*, *in tubo* and *in vitro* exposures. *Environ Pollut* 2008;153(2):416–23.
- [48] Zaja R, Klobucar G, Sauerborn Klobucar R, Hackenberger BK, Smil T. Haemolymph as compartment for efficient and non-destructive determination of P-glycoprotein (Pgp) mediated MXR activity in bivalves. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2006;143(1):103–12.
- [49] Auffret M, Rousseau S, Boutet I, Tanguy A, Baron J, Moraga D, et al. A multi-parametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicol Environ Saf* 2006;63(3):393–405.
- [50] Akaiishi FM, St-Jean SD, Bishay F, Clarke J, Rabbito IdaS, de Oliveira Ribeiro CA. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. *Aquat Toxicol* 2007;82(1):1–14.
- [51] Scott CC, Botelho RJ, Grinstein S. Phagosome maturation: a few bugs in the system. *J Membr Biol* 2003;193(3):137–52.
- [52] Lopez C, Carballal MJ, Azevedo C, Villalba A. Morphological characterization of the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *J Invertebr Pathol* 1997;69(1):51–7.
- [53] Haapaniemi H, Tomita M, Tanahashi N, Takeda H, Yokoyama M, Fukuchi Y. Non-amoeboid locomotion of cultured microglia obtained from newborn rat brain. *Neurosci Lett* 1995;193(2):121–4.
- [54] Cajaraville MP, Olabarrieta I, Marigomez I. *In vitro* activities in mussel hemocytes as biomarkers of environmental quality: a case study in the Abra Estuary (Biscay Bay). *Ecotoxicol Environ Saf* 1996;35(3):253–60.
- [55] Clark KD, Pech LL, Strand MR. Isolation and identification of a plasmacyte-spreading peptide from the hemolymph of the lepidopteran insect *Pseudaletia includens*. *J Biol Chem* 1997;272(37):23440–7.
- [56] Clark KD, Volkman BF, Thoetkiathikul H, King D, Hayakawa Y, Strand MR. Alanine-scanning mutagenesis of plasmacyte spreading peptide identifies critical residues for biological activity. *J Biol Chem* 2001;276(21):18491–6.
- [57] Laval-Gilly P, Falla J, Klestadt D, Henryon M. A new approach to evaluate toxicity of gases on mobile cells in culture. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000;44(3):483–8.



## Cell tracking and velocimetric parameters analysis as an approach to assess activity of mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes in vitro.

Riout, D., Lebel, J.-M., & Le Foll, F.

(2013)

Les hémocytes constituent l'élément clé de l'immunité innée des bivalves. Ils sont responsables : de la sécrétion de peptides antimicrobiens et de la libération de zymogènes du système prophénoloxydase dans le compartiment hémolympatique, de la production d'espèces réactives de l'oxygène et de la phagocytose. Les hémocytes sont retrouvés (et collectés) en suspension dans l'hémolymphe circulante. Ce sont des cellules adhérentes capables d'infiltrer les tissus et de migrer vers les zones infectées. Dans cette étude, nous avons développé une approche basée sur le marquage fluorescent et le suivi des noyaux pour déterminer la vitesse de migration des hémocytes de la moule bleue, *Mytilus edulis*, en culture. Les cellules fraîchement recueillies adhèrent au substrat et commencent à se déplacer spontanément en quelques minutes. Deux principales morphologies hémocytaires peuvent être observées: des petites cellules en forme d'étoile, peu motiles, et des cellules étalées granulaires aux migrations rapides. Le tracking cellulaire a été combiné à la mesure de taux métaboliques mitochondriaux par tests MTT, afin de contrôler l'activité de la population globale après plus de 4 jours de culture. Un pic transitoire de l'activité des cellules a été enregistré après 24 à 48 h de culture, correspondant à l'accélération des vitesses de migration cellulaire. La vidéo-microscopie et la technique de suivi cellulaire offrent de nouveaux outils pour caractériser l'activité des immunocytes de moules en culture. Notre analyse de la migration hémocytaire révèle que la mobilité est très sensible aux facteurs environnementaux cellulaires.

*Cytotechnology* 65(5), 749-758.

doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10616-013-9558-2>

# Cell tracking and velocimetric parameters analysis as an approach to assess activity of mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes in vitro.

2013  
Cytotechnology

Di	P	H	Te	R	I	C
Données initiales	Problèmes	Hypothèses	Tests	Résultats	Interprétations	Conclusions
Les hémocytes se déplacent en culture.	Comment quantifier ces déplacements, avec une dimension statistique, malgré les déformations membranaires importantes ?	Les noyaux ne se déforment pas et suivent le déplacement de la cellule. Il est possible de tracker automatiquement les noyaux.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Videomicroscopie au x40 Hoffmann.</li> <li>Marquage des noyaux au Hoechst 33342 avec setup de time-lapse en épifluo.</li> </ul>	<p>Les vitesses moyennes (n=80), en culture dans du MPSS sur substrat en plastique et à 14°C s'échelonnent entre 1 et 7 <math>\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}</math>.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Toutes les cellules s'attachent au substrat.</li> <li>Le suivi simultané de 20 noyaux est possible.</li> <li>Les cellules sont vivantes pendant au moins 4j dans ces conditions de culture.</li> <li>Les vitesses sont comparables à celles des neutrophiles extravasculaires à 37°C.</li> </ul>	<p>Le tracking nucléaire est une méthode fiable et intégrative de la viabilité et de l'activité des hémocytes.</p>
Les cellules peuvent être maintenues quelques jours en culture primaire.	Les vitesses sont-elles constantes au cours du temps ?	Une diminution des vitesses accompagne probablement la sénescence cellulaire.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Suivi de l'activité mitochondriale au MTT.</li> <li>Suivi des vitesses après marquage des noyaux.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La réponse MTT au prélèvement est dispersée.</li> <li>Les cellules accélèrent après 24-48h, puis ralentissent.</li> <li>Il y a un pic métabolique à 48 h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Le comptage des hémocytes par prélèvement dans le muscle adducteur n'est pas reproductible.</li> <li>L'augmentation des vitesses et de la réponse MTT évoquent une réponse inflammatoire.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Quels paramètres peuvent faire varier la motilité ?</li> <li>Pourquoi et comment les cellules s'activent-elles ?</li> </ul>
Données post-étude						
<b>Dpe</b>						<b>NP</b> ...
						Nouveaux Problèmes

## Cell tracking and velocimetric parameters analysis as an approach to assess activity of mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes in vitro

Damien Rioult · Jean-Marc Lebel · Frank Le Foll

Received: 23 November 2012 / Accepted: 22 March 2013 / Published online: 12 April 2013  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

**Abstract** Hemocytes constitute the key element of innate immunity in bivalves, being responsible for secretion of antimicrobial peptides and release of zymogens from the prophenoloxidase system within the hemolymph compartment, reactive oxygen species production and phagocytosis. Hemocytes are found (and collected) as cells in suspension in circulating hemolymph. Hemocytes are adherent cells as well, infiltrating tissues and migrating to infected areas. In the present study, we applied an approach based on fluorescent staining and nuclei-tracking to determine migration velocity of hemocytes from the blue mussel, *Mytilus edulis*, in culture. Freshly collected hemocytes attached to substrate and start to move spontaneously in few minutes. Two main hemocyte morphologies can be observed: small star-shaped cells which were less motile and spread granular cells with faster migrations. Cell-tracking was combined to MTT mitochondria metabolic rate

measurements in order to monitor global cell population activity over 4 days of culture. A transient peak of cell activity was recorded after 24–48 h of culture, corresponding to a speed up of cell migration. Videomicroscopy and cell tracking techniques provide new tools to characterize activity of mussel immunocytes in culture. Our analysis of hemocyte migration reveals that motility is very sensitive to cell environmental factors.

**Keywords** Marine Invertebrate · Primary cultures · Motility · Cell-tracking · Innate Immunity · Molluscs

### Introduction

The blue mussel *Mytilus edulis* is a bivalve belonging to Mollusca, a phylum comprising the largest number of described marine species (Ponder and Lindberg 2008). These animals, living in complex estuarine and intertidal environments, experience major fluctuations of physico-chemical parameters in coastal areas (Gauthier-Clerc et al. 2013; Malagoli et al. 2007). In addition to those abiotic stressors, mussels house a variety of endoparasites and microbial organisms (Venier et al. 2011). To control host-pathogen interactions and to respond immediately to invaders, mussels as others invertebrates, rely on innate immunity. Hemocytes found in hemolymph and infiltrating tissues, constitute a heterogeneous population of immune cells actively specialized in pleiotropic defences against pathogens (Carballal et al. 1997; Donaghy and Volety 2011;

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10616-013-9558-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

D. Rioult (✉) · F. Le Foll  
Laboratory of Ecotoxicology, EA 3222, FED 4116  
SCALE, University of Le Havre,  
76058 Le Havre Cedex, France  
e-mail: drioult@free.fr; damien.rioult@univ-lehavre.fr

J.-M. Lebel  
CNRS INEE, FRE3484 BioMEA Biologie des  
Mollusques marins et des Ecosystèmes Associés, IBFA,  
University of Caen, 14032 Caen Cedex, France

Le Foll et al. 2010). During the inflammatory response, activated hemocytes execute several major functions of cell-mediated innate immunity, including cytotoxic production of oxygen (Costa et al. 2009; Winston et al. 1996) or nitrogen species (Novas et al. 2007), increased production of lysozymes (Li et al. 2008) and phagocytosis (Carballal et al. 1997; Garcia-Garcia et al. 2008; Le Foll et al. 2010; Malagoli et al. 2007).

To be effective in host-defense, hemocytes do not require prior exposure to antigens but can express a vast repertoire of immune-related genes, over-represented in bivalves, as revealed by recent reports on sequencing of oyster genome (Zhang et al. 2012) and analyses of mussel transcriptomes after biotic and abiotic stress challenges (Craft et al. 2010; Philipp et al. 2012; Venier et al. 2011). Despite this more precise picture of molecular diversity, identity and evolution of mussel gene products acting as non-self recognition sensors, cytokine regulators, antimicrobial peptides or apoptosis/autophagy effectors (Philipp et al. 2012; Venier et al. 2011), the overall physiology of innate immunity in *Mytilidae* remains poorly understood. In particular, whereas different types of hemocytes have been described so far (Cajaraville and Pal 1995; Friebe and Renwantz 1995; Hine 1999; Le Foll et al. 2010; Parisi et al. 2008; Donaghy and Volety 2011), the origin, the role and the activation steps of hemocyte subpopulations are unknown. Furthermore, except for phagocytosis (Garcia-Garcia et al. 2008; Le Foll et al. 2010; Voccia et al. 1994), consensual protocols quantifying hemocyte activity or functional markers of inflammatory states are still lacking.

An early and key stage of immune response consists in hemocyte recruitment and migration to the site of infection. We have previously shown that time-lapse videomicroscopy allows investigations on dynamics of mussel hemocytes shape changes and helps to propose a functional classification of cell subtypes (Le Foll et al. 2010). In the present study, we describe a novel approach based on fluorescent staining and nuclei-tracking to determine migration velocity of hemocytes in vitro. This method was applied to follow hemocyte activity over several days of culture.

## Materials and methods

### Reagents

Most compounds were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). A stock solution of

polyethyleneimine (PEI) was prepared from 1 g of liquid PEI (50 % w/v in water) diluted in 10 mL sterile deionised water. Hoechst 33342 was supplied by Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

### Hemolymph withdrawal

Adult mussels (4–5 cm shell length), *M. edulis*, were collected on the intertidal rocky shore of Yport (0°18'52"E:49°44'30"N, Seine-Maritime, France) between April and June 2012 (sea surface temperature between 10 and 13 °C). Mussels were transported to the laboratory and directly used. Typically, hemolymph was aseptically withdrawn in a BSL2 laminar flow cabinet from the posterior adductor muscle sinus by gentle aspiration with a 1 mL syringe equipped with a 22G needle. Hemocytes used in the present study were withdrawn from 132 mussels collected, without hemolymph pooling.

### Hemocytes culture

Distinct cell cultures were carried out from distinct individuals. In some experiments, culture plastic substrates were coated for 2 h at room temperature with PEI diluted 1/10000 from the stock solution, washed 3 times with sterile deionised water and let to dry in the BSL2 cabinet. Volumes of crude hemolymph corresponding to 100 or 200 µL from one single individual were deposited in 35-mm culture dishes (Corning, Corning, NY, USA) or in each well of 96-well culture plates, respectively. After 30 min of sedimentation, hemolymph was removed and each well or dish were washed twice by using marine physiological saline solution (MPSS) containing (in mM): 470 NaCl, 10 KCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 10 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (Hepes), 48.7 MgSO<sub>4</sub>, pH 7.8, 0.2 µm filtered. The cells were covered with sterile MPSS supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 µg mL<sup>-1</sup> streptomycin, 60 µg mL<sup>-1</sup> penicillin G. The cells were then maintained at 14 °C in a temperature-controlled incubator.

### MTT bioassay

A MTT assay was used to determine cell number in each well. In the presence of viable cells, MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, is enzymatically reduced to the purple dye

formazan. The assay was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, hemocytes were softly placed in 96-well cell culture plates and allowed to adhere for 30 min at 14 °C. Thereafter, cells were rinsed with MPSS and incubated in MPSS containing 0.2 mg mL<sup>-1</sup> MTT. After 4 h at 14 °C, the MTT solution was removed and 200 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to each well to solubilize formazan crystals. The absorbance was then measured at a wavelength of 570 nm with a 630 nm reference using a micro plate reader (Elx808; Biotek, Winooski, VT, USA).

#### Microscopy set-up

A culture dish was placed on the stage of a TE-2000 inverted microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France) equipped for epifluorescence excitation and time-lapse imaging with a moderately-cooled high-resolution charge-coupled device (CoolSnap EZ; Photometrics, Tucson, AZ, USA). A Peltier temperature controller (PDMI-2 and TC-202A; Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) keeps preparation at 14 °C for extended live cell imaging. Bright field images were acquired with a 40× Hoffman modulation contrast objective (numerical aperture 0.55). For epifluorescence time-lapse imaging, the same objective was used and, to prevent bleaching or phototoxicity, a VCM-D1 shutter (Uniblitz, Vincent Associates, Rochester, NY, USA) was added in the illumination pathway to cut off the excitation light between two image recordings. Camera and shutter were controlled by using Metamorph (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA) as acquisition software. Coolsnap camera captured a 12-bit digital of 1,392 × 1,040 pixels grayscale images every 30 s for 30 min. 1 pixel represent a 6.45 × 6.45-µm square. Camera and software were calibrated with the 40× objective to express distance in microns.

#### Bright field videomicroscopy

One hundred microliter of freshly withdrawn hemolymph were placed in a 35 mm non treated polystyrene culture dish (BD Falcon Easy Grip, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Cells were allowed to adhere for 30 min at room temperature and covered by 2 mL of MPSS. The culture dish was transferred on the stage of a TE-2000 inverted

microscope for time lapse imaging using the 40× Hoffman modulation contrast objectives.

#### Cells tracking and analysis

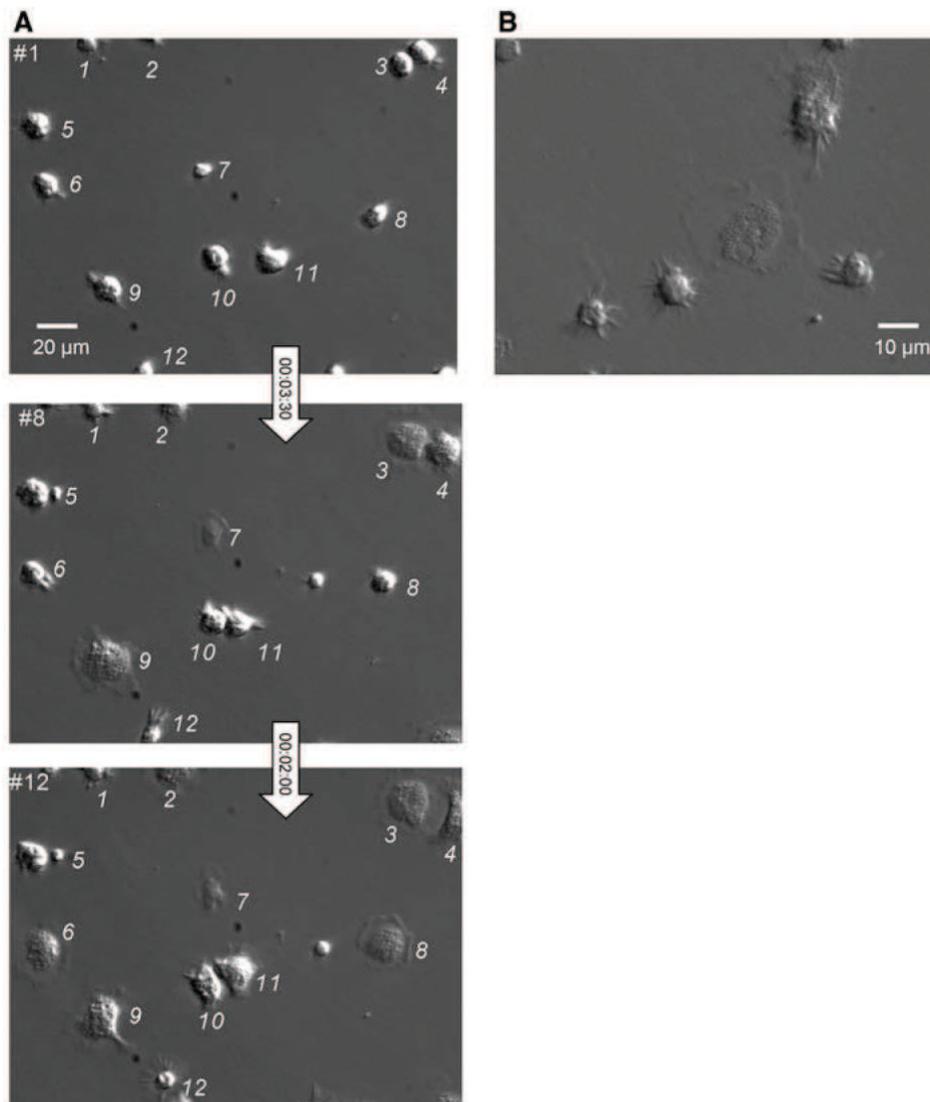
To quantify velocity, cells in culture were incubated with 10 µM of the nuclei-specific fluorescent probe Hoechst 33342 for 30 min at 14 °C. Afterwards, the culture dish was transferred on the stage of the microscope to record movies. Hoffman modulation contrast optics were used to obtain cells images before and after the fluorescence imaging. Movie was imported into Metamorph Analysis software. Track Objects application (available with Multi-Dimensional Motion Analysis option) was started. Twenty nuclei were randomly chosen to be tracked. Extracted data were transferred to a spreadsheet and, for each cell, the mean distance travelled during 30 s was calculated and multiplied by 2 to express velocity in µm min<sup>-1</sup>.

#### Statistical analysis

All quantitative data were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) in MTT scatter plots or as percentiles in box charts. Statistical analysis was performed by using SigmaPlot 12 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA). A Shapiro–Wilk normality test, with a  $p = 0.05$  rejection value, was used to test normal distribution of data prior to further analysis. All pairwise multiple comparisons were performed by one way ANOVA followed by Holm–Sidak posthoc tests for data with normal distribution or by Kruskal–Wallis analysis of variance on ranks followed by Tukey posthoc tests, in case of failed normality test. Statistical significance was accepted for  $p < 0.05$  (\*).

## Results

To investigate in vitro hemocyte attachment dynamics, hemolymph was withdrawn from the posterior adductor muscle sinus of mussels and directly deposited, without pooling or centrifugation, in small volumes (typically 100 µL) onto uncoated polystyrene culture substrates. Hemolymph was immediately covered with MPSS. This procedure actually prevents hemocyte aggregation. Hoffman modulation contrast (HMC) time-lapse videomicroscopy, at a rate of

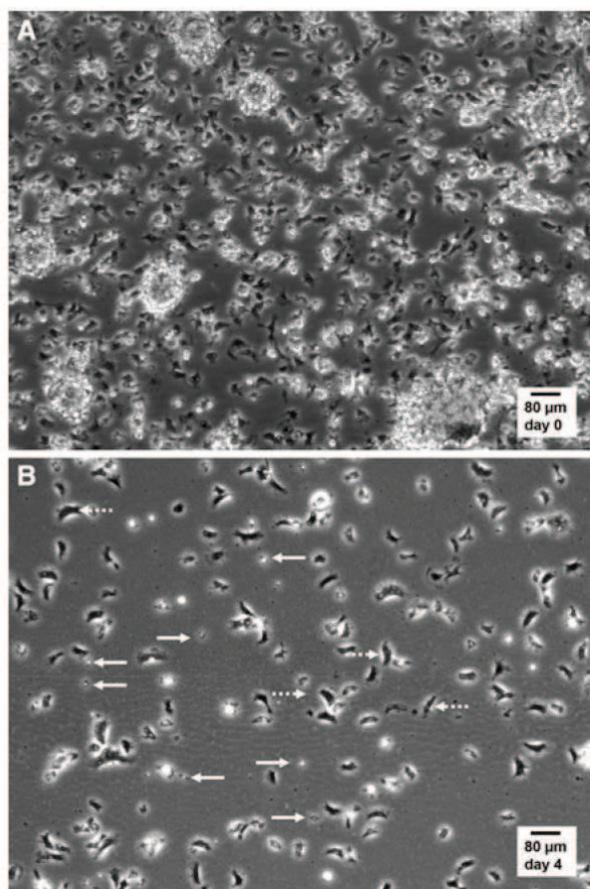


**Fig. 1** Hoffman modulation contrast time-lapse imaging of hemocyte attachment in vitro **a** Immediately after withdrawal from the adductor posterior muscle of a single mussel, a droplet of hemolymph was deposited onto a non-treated polystyrene culture dish and covered by MPSS. Cell attachment and movements were monitored by dynamic microscopy at the rate of 1 image every 30 s under  $\times 40$  Hoffman modulation contrast magnification. Three of the firsts 12 frames (numbered in the up-left corner) corresponding to the same microscopic field are shown. Time intervals are indicated in the arrows (hours:minutes:seconds). To be followed from frame to frame, cells were

identified by numbers. Note that most of the cells spread within 5 min (#3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11) while a small number remained star-shaped (#1 and 12). Consult online supplementary video\_1 for visualisation of hemocytes in motion. **b** After hemolymph collection as in (a), cells were allowed to adhere during 20 min in a polyethyleneimine-coated culture dish. A freeze-frame from a 30-min time-lapse recording is shown, illustrating the main typical shapes of isolated hemocytes, with large spread granular cells distinct from small hemocytes with a round-body surrounded by fast moving filopodia. Video\_2 shows that cells kept their shapes during the whole recording

1 image every 30 s, was then carried out to image hemocytes, as shown in Fig. 1a and supplementary video\_1. In these conditions, most hemocytes achieved sedimentation and reached the bottom of culture dish within seconds. Following this first step, a majority of round cells changed their shape to adopt a

spread outline, revealing a granular cytoplasm and showing amoeboid displacements based on lamellipodia movements. Membrane edges were particularly active as revealed by the presence of numerous transient margin ruffles. Apparently however, some cells were keeping a round body with narrow fast



**Fig. 2** Still micrographs extracted from live cell time-lapse imaging of mussel hemocytes in culture. Hemocytes in suspension in hemolymph were collected, plated and cultured in MPSS at 14 °C as described in “Materials and methods” section and in Fig. 1. Time-lapse recordings were performed at 14 °C in a Peltier-cooling microscope stage with  $\times 10$  phase contrast objective lens. **a** Representative image selected from supplementary video\_3 (duration 30 min, 1 image per 30 s), recorded in the droplet of hemolymph, immediately after the initial 20-min phase of adherence and before adding MPSS. Notice the high cell density and the presence of hemocyte aggregates. **b** Representative image selected from supplementary video\_4 (duration 30 min, 1 image per 30 s), recorded after 4 days of culture in MPSS. Spread bipolar cells covered large distances by amoeboid movements (*dotted arrows*), while small round star-shaped hemocytes displayed static filopodia protrusions (*solid arrows*)

moving thick filopodia. In order to follow hemocyte shape changes in condition of limited cell displacements, some experiments were repeated on polyethyleneimine-coated culture dishes. This surface treatment promotes cell adhesion (Lelong et al. 1992). In these conditions, morphologic differences between round filopodia-exhibiting cells and spread

granulocytes were enhanced (Fig. 1b and supplementary video\_2).

In order to characterize hemocyte motility, phase contrast wide field long-term time-lapse recordings (1 image/30 s) were performed at 14 °C under controlled temperature. Typically, after plating, cells were allowed to adhere 20 min and then imaged over 30 min in the drop of hemolymph. In the representative video (supplementary video\_3) and the corresponding snapshot (Fig. 2a), the hemocytes appeared to be attached at high density onto the culture substrate, in a mixture of dispersed cells and small sparse aggregates. The cell population was highly motile, with nonstop deformations and random displacements. Hemocytes frequently crossed over each other. After 4 days of culture in marine physiological salt solution (MPSS), the density of hemocytes decreased, mainly because the cells were now distributed on the whole culture surface (11.78 cm<sup>2</sup>). Cells were mainly individualized and no aggregate were observed. The two main hemocyte morphologies can be easily distinguished (Fig. 2b and video\_4), small star-shaped weakly motile cells (solid arrows) and spread granular cells in fast motion with, for the most part of time, a bipolar bean shape (dashed arrows).

To quantify hemocyte velocity, we had to track simultaneously several motile cells with continuous outline deformations. To simplify the approach, we chose to follow the position of nuclei over time, after vital staining with the DNA fluorescent probe Hoechst 33342. Figure 3a, b shows time-lapse fluorescent images of nuclei obtained at 5 min intervals, with corresponding HMC micrographs at the beginning and at the end of sequences and with superimposed trajectories for the last image (see also supplementary video\_5 and video\_6). Using this methods, nuclei can be stained immediately before tracking and followed over 30 min. To compare motile activity to cell viability, MTT was used as an indicator of metabolically active mitochondria. However, preliminary results gave great variability in MTT responses immediately after plating. Therefore, we undertook an estimation of repeatability of hemolymph puncture by carrying out MTT bioassays on hemolymph samples collected on a homogeneous pool of 99 mussels and withdrawn by the same operator. Results revealed a wide distribution of MTT OD, with values from 0.05 to 1.05 (Fig. 4a). A Log normal relation can be fitted to the distribution of hemocyte content in hemolymph

samples (histogram binning by 0.05 MTT OD width), only after arbitrary rejection of the first two classes. No other distributions were explored. Despite variability of hemolymph collection, MTT responses increased linearly (slope  $9.91 \times 10^{-4} \pm 2.80 \times 10^{-4}$  MTT OD unit/hemolymph  $\mu\text{L}$ ,  $r^2 = 0.9925$ ) with tested hemolymph volumes (Fig. 4b). This latter result indicates that cell viability can be monitored in cell cultures by using MTT OD relative to values obtained at plating.

Hemocyte velocity determination by nuclei tracking were combined to mitochondria metabolic rate measurements, assessed by MTT bioassays, in order to monitor global cell population activity over 4 days of culture in MPSS at 14 °C. Velocity measurements were performed on a set of 20 hemocytes, selected randomly in the microscopic field after 30 min time-lapse recording, in a separate culture dish for each day of experiment. Cells escaping the recorded field or belonging to aggregates were excluded from the analysis. Four independent culture replicates have been carried out, giving a total of 80 hemocyte velocities per time point. The first day of culture, the mean cell velocity was established at  $2.78 \pm 0.12 \mu\text{m min}^{-1}$  ( $n = 80$ , Fig. 5a). The 5th/95th percentiles, corresponding the 5 % of the population with slowest and fastest migration speeds, show velocities of 0.95 and  $4.25 \mu\text{m min}^{-1}$ , respectively. After 24 h of culture, migration velocities increased transiently and significantly to reach a mean value of  $4.56 \pm 0.17 \mu\text{m min}^{-1}$ . This effect was accompanied by a dispersion of speed extrema, with values of 1.45 and  $7.10 \mu\text{m min}^{-1}$  for the 5th and 95th percentiles, respectively. Hemocyte motile activity then declined progressively, to meet initial mean and dispersion at days 3 and 4. Concomitant MTT bioassays revealed a significant peak of metabolic activity at day 2, followed by a decrease of MTT OD below afterwards, with final values (Fig. 5b).

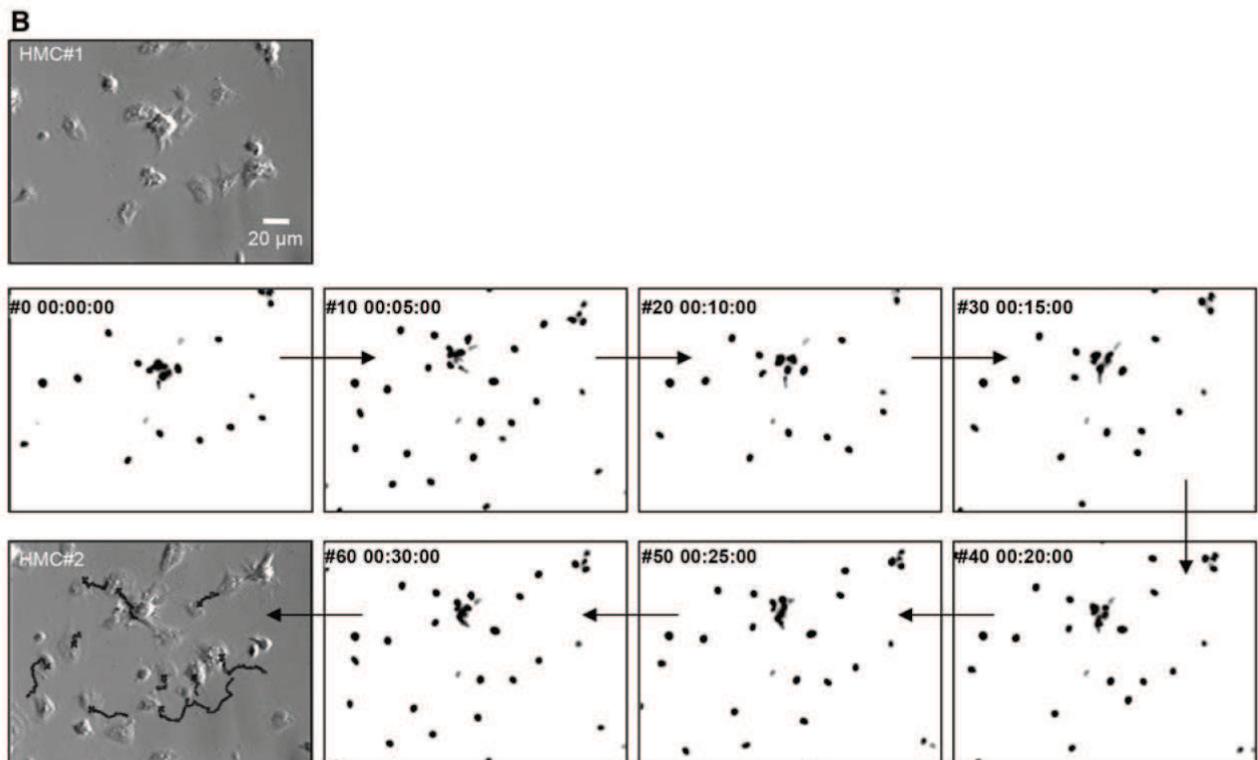
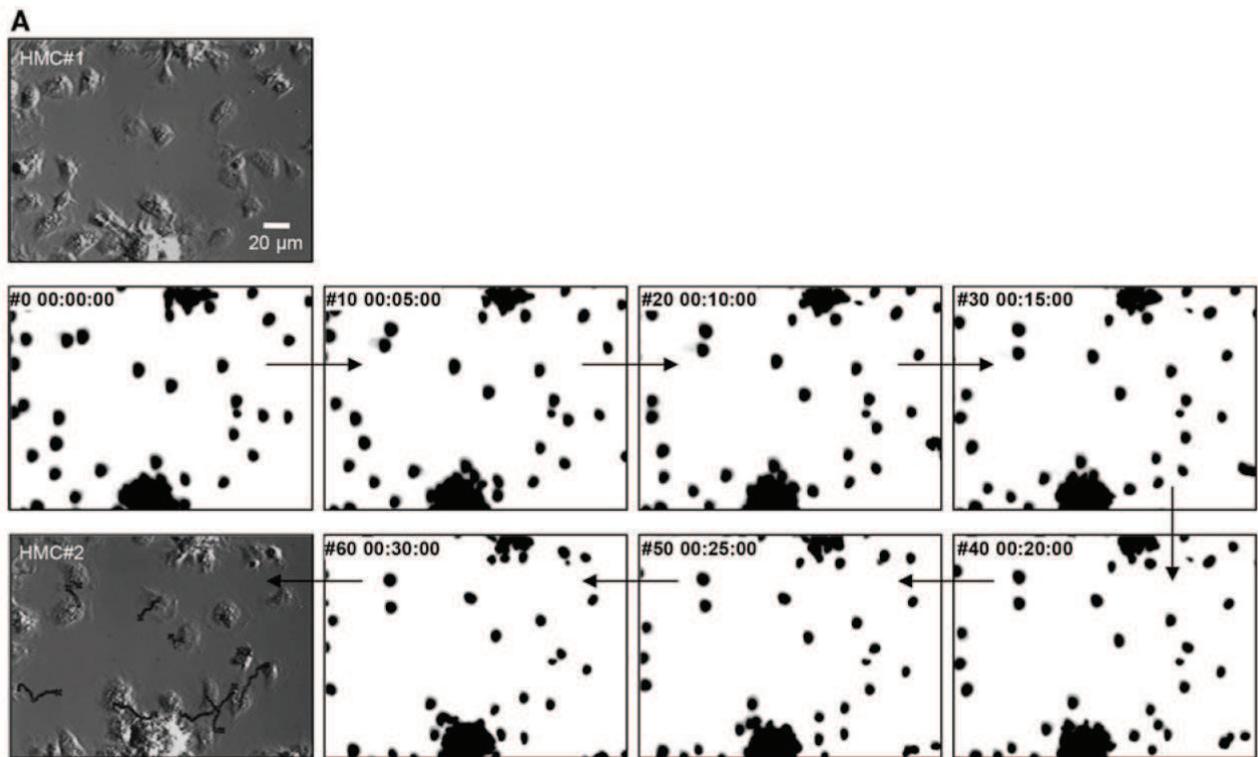
## Discussion

In this work, we provide for the first time a quantitative value for mussel hemocyte velocity in vitro, by recording hemocyte cell populations in condition of random walk in free field. The mean initial migration speed,  $2.78 \mu\text{m min}^{-1}$  at 14 °C in MPSS, is similar to velocities reported for human extravascular neutrophils

**Fig. 3** Determination of cell trajectories and velocities by live cell nuclei tracking. Hemocyte nuclei were specifically stained with Hoechst 33342. Wide field epifluorescence microscopy was used for time-lapse recording of nuclei movements under  $\times 40$  magnification. **a** and **b** correspond to distinct recordings (video\_5 and video\_6), where initial positions of hemocytes in the microscope field are shown in a first Hoffman modulation contrast micrograph (HMC#1). Several inverted images of hemocyte nuclei fluorescence at 5 min intervals are shown. A final HMC micrograph is presented at the end of the sequence (HMC#2) with different reconstituted nuclei trajectories superimposed

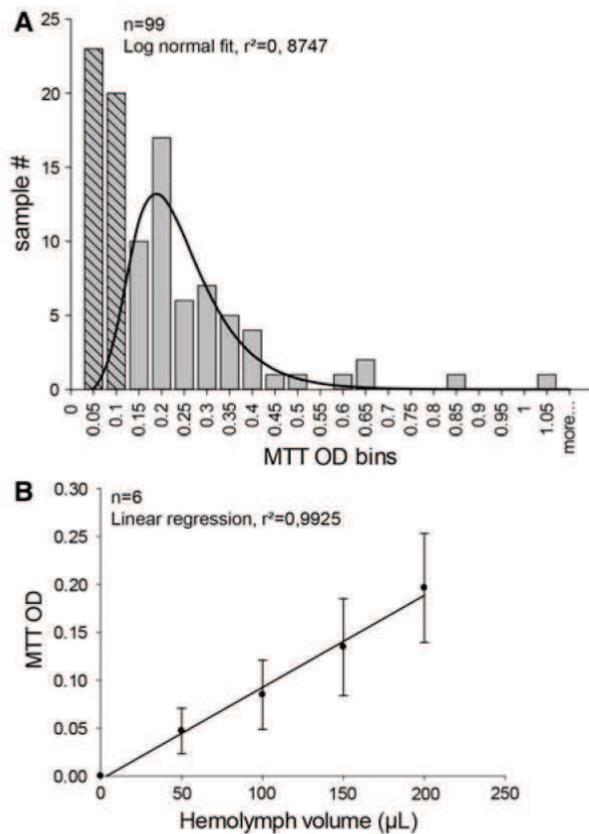
in vivo ( $2.88 \mu\text{m min}^{-1}$ ) at 37 °C (Kreisel et al. 2010). This reveals that mussel hemocytes can be considered as relatively strong motile cells. Our results also indicate that these cells can be maintained in culture at least 4 days in a basal saline medium, since hemocytes still had similar migration speeds after this period. The temperature of 14 °C was the lowest value achievable by the Peltier-cooled microincubator for continuous imaging under the microscope stage and was therefore also used as set point for the cell culture incubator.

The initial velocity recorded at the onset of culture transiently increased to peak at  $4.5 \mu\text{m min}^{-1}$  (mean populational value) after 24 h, fastest cells exhibiting speeds over  $7 \mu\text{m min}^{-1}$ . This observation could be ascribed to an activation of hemocytes, evocative of an inflammatory response, after withdrawal and plating in the culture environment. This hypothesis is supported by the contemporaneous transient rise of mitochondria metabolic rate revealed by MTT tests. In addition, when deposited in a culture dish, hemocytes collected in suspension in hemolymph immediately attached to the plastic substrate. No cell was observed to remain in suspension. Cell attachment to substrate *per se* may participate to the increase of immune activity and respiratory burst. In mammals, immune cells are known to migrate rapidly towards the site of infection (Abadie et al. 2005; Chtanova et al. 2008; Germain et al. 2012). Interestingly, *ex vivo* explant experiments give evidence for accelerated random migration of immune cells, at rates of  $8 \mu\text{m min}^{-1}$ , similar to interstitial velocities reported for neutrophils at sites of inflammation (Graham et al. 2009; Kreisel et al. 2010). These data are in a good agreement with the highest velocities measured from mussel hemocytes herein. Also in accordance with stimulations of hemocyte motility induced by microbial infections, a recent study reported hemocyte migration within adductor muscle of *Mytilus*



*galloprovincialis* injected with *Vibrio splendidus* LGP32 (Li et al. 2008). Obviously, these findings lead to include hemocyte migration velocity within the

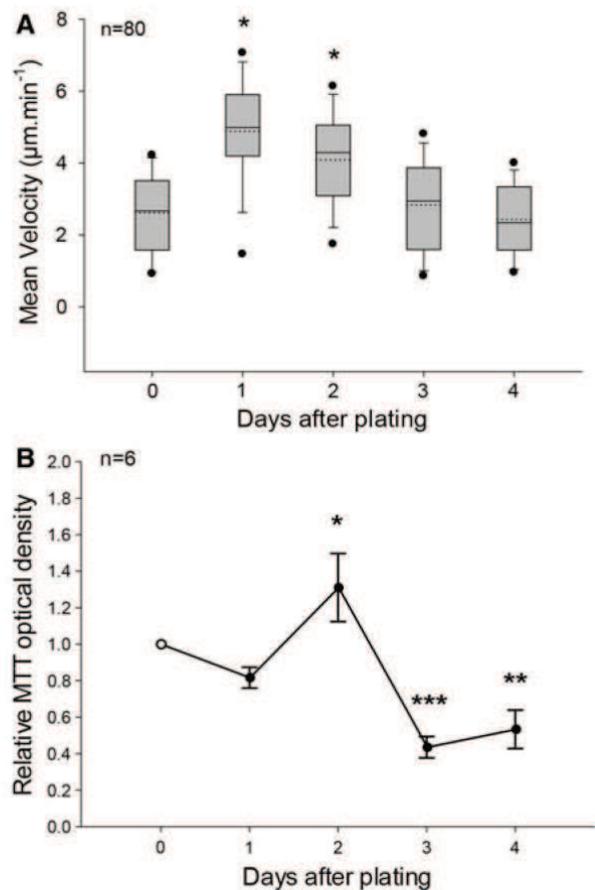
physiological parameters useful to describe the status of innate immunity in bivalves. In particular, motility monitoring appears to be an excellent indicator of cell



**Fig. 4** Assessment of hemocyte content in hemolymph samples by MTT bioassays. **a** To estimate repeatability of hemolymph withdrawal, samples of hemolymph were collected from 99 individual mussels. A volume of 200  $\mu\text{L}$  from each sample was used to determine cell content via MTT bioassays. Resulting optical densities were binned into 22 levels from 0 to 1.05. The first two bins were ignored and the histogram was fitted by a Log normal distribution, giving a peak at  $\text{OD} = 0.22 \pm 0.01$  ( $r^2 = 0.87$ ). **b** Volumes ranging from 50 to 200  $\mu\text{L}$  of raw hemolymph from 6 mussels were used to measure linearity of MTT responses. Linear regression of mean MTT OD gives a slope of  $9.91 \times 10^{-4} \pm 2.80 \times 10^{-4}$  MTT O.D. unit/hemolymph  $\mu\text{L}$  with  $r^2 = 0.9925$

activity in culture, in addition to common viability tests such as MTT.

The time-related variations in migration speed of mussel hemocytes in culture indicate that motility is regulated. The dispersion of velocities between slowest and fastest cells, enhanced at the peak of speed, may reflect the presence of distinct cell subpopulations. Given that (1) fluorescent nuclei were randomly selected for cell tracking and (2) hemocytes were capable of fast shape changes, we consider that these differences cannot be definitely attributed to the occurrence of previously characterized less-motile



**Fig. 5** Evolution of hemocyte velocity and mitochondrial metabolic rate in vitro. **a** Mean velocities were computed from migration distances recorded during 30-min time-lapse nuclei tracking in the culture dish after Hoechst 33342 staining. In 4 replicated cell cultures obtained from individuals, mean cell velocities were determined from 20 trajectories at days 0, 1, 2, 3 and 4 and plotted in a box chart. Box boundaries indicate the 25th (bottom) and the 75th (top) percentiles. A solid line within the box marks the median, and a dashed line the mean. Whiskers below and above the box indicate the 10th/90th percentiles. Outlying points show the 5th/95th percentiles. Velocities significantly different from value at day 0 are indicated ( $*p < 0.05$ , Kuskal-Wallis ANOVA on ranks, Tukey post hoc). **b** Changes in MTT responses of cultured hemocytes over time, expressed as a ratio  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ) relative to seeding values at day 0 (open circle). MTT OD significantly different from value at day 0 are indicated ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ , one-way ANOVA, Holm-Sidak post hoc)

small round basophils and spread eosinophilic granulocytes (Le Foll et al. 2010). Again, fast shape changes associated to hemocyte motion and cell to cell interactions should trigger caution when interpreting morphological variations as makers of effects (Magazine et al. 1996; Hoher et al. 2012). In addition, attention should be drawn to variability of MTT

responses in fresh hemolymph samples. This result can be accounted for by interindividual differences in total hemocyte count or in distribution between circulating and infiltrated cells, as already suggested (Cajaraville and Pal 1995; Hoher et al. 2012; Hughes et al. 1991; Li et al. 2008), but also by a poor reproducibility in hemolymph sampling. However, in our experiments, MTT OD varied linearly as a function of plated hemolymph volumes. MTT viability bioassays can therefore be used to follow global activity in hemocyte cultures, when expressed relatively to the initial value at plating.

In conclusion, the present work provides a novel approach to investigate hemocyte activity. Our analysis of mussel hemocyte migration highly suggests that motility is very sensitive to cell environmental factors, including cell sampling and/or culturing. Mussel hemocyte migration studies may be of prime pathophysiological significance since two independent transcriptomic studies have identified a conserved cytokine involved in innate immunocyte migration control, the macrophage migration inhibitory factor (MIF), as a major immune-related transcript (Philipp et al. 2012; Venier et al. 2011). The method described herein could be used in further investigations aiming at characterizing hemocyte motility in response to seasonal variations, environment changes, bacterial challenges and chemoattractants.

**Acknowledgments** This work was supported by grants from the State/Region Plan Contract (CPER) allocated through the Research Federation FED 4116 SCALE (Sciences Appliquées à L'Environnement). Damien Rioult were recipients for doctoral fellowships from the Conseil Régional de Haute-Normandie.

## References

- Abadie V, Badell E, Douillard P, Ensergueix D, Leenen PJ, Tanguy M, Fiette L, Saeland S, Gicquel B, Winter N (2005) Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood* 106:1843–1850. doi:10.1182/blood-2005-03-1281
- Cajaraville MP, Pal SG (1995) Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment. *Cell Struct Funct* 20:355–367
- Carballal MJ, Lopez C, Azevedo C, Villalba A (1997) Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J Invertebr Pathol* 70:96–105
- Chtanova T, Schaeffer M, Han SJ, van Dooren GG, Nollmann M, Herzmark P, Chan SW, Satija H, Camfield K, Aaron H, Striepen B, Robey EA (2008) Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection. *Immunity* 29:487–496. doi:10.1016/j.immuni.2008.07.012
- Costa MM, Prado-Alvarez M, Gestal C, Li H, Roch P, Novoa B, Figueras A (2009) Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish Shellfish Immunol* 26:515–523
- Craft JA, Gilbert JA, Temperton B, Dempsey KE, Ashelford K, Tiwari B, Hutchinson TH, Chipman JK (2010) Pyrosequencing of *Mytilus galloprovincialis* cDNAs: tissue-specific expression patterns. *PLoS ONE* 5:e8875. doi:10.1371/journal.pone.0008875
- Donaghy L, Volety AK (2011) Functional and metabolic characterization of hemocytes of the green mussel, *Perna viridis*: in vitro impacts of temperature. *Fish Shellfish Immunol* 31:808–814
- Friebel B, Renwrandt L (1995) Application of density gradient centrifugation for separation of eosinophilic and basophilic hemocytes from *Mytilus edulis* and characterization of both cell groups. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 112A:81–90
- Garcia-Garcia E, Prado-Alvarez M, Novoa B, Figueras A, Rosales C (2008) Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families. *Dev Comp Immunol* 32:637–653
- Gauthier-Clerc S, Boily I, Fournier M, Lemarchand K (2013) In vivo exposure of *Mytilus edulis* to living enteric bacteria: a threat for immune competency? *Environ Sci Pollut Res Int* 20(2):612–620. doi:10.1007/s11356-012-1200-x
- Germain RN, Robey EA, Cahalan MD (2012) A decade of imaging cellular motility and interaction dynamics in the immune system. *Science* 336:1676–1681. doi:10.1126/science.1221063
- Graham DB, Zinselmeyer BH, Mascarenhas F, Delgado R, Miller MJ, Swat W (2009) ITAM signaling by Vav family Rho guanine nucleotide exchange factors regulates interstitial transit rates of neutrophils in vivo. *PLoS ONE* 4:e4652. doi:10.1371/journal.pone.0004652
- Hine P (1999) The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 9:367–385
- Hoher N, Kohler A, Strand J, Broeg K (2012) Effects of various pollutant mixtures on immune responses of the blue mussel (*Mytilus edulis*) collected at a salinity gradient in Danish coastal waters. *Mar Environ Res* 75:35–44. doi:10.1016/j.marenvres.2011.11.003
- Hughes TK Jr, Smith EM, Barnett JA, Charles R, Stefano GB (1991) Lipopolysaccharide and opioids activate distinct populations of *Mytilus edulis* immunocytes. *Cell Tissue Res* 264:317–320
- Kreisel D, Nava RG, Li W, Zinselmeyer BH, Wang B, Lai J, Pless R, Gelman AE, Krupnick AS, Miller MJ (2010) In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:18073–18078. doi:10.1073/pnas.1008737107
- Le Foll F, Rioult D, Boussa S, Pasquier J, Dagher Z, Leboulenger F (2010) Characterisation of *Mytilus edulis*

- hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. *Fish Shellfish Immunol* 28:372–386. doi: [10.1016/j.fsi.2009.11.011](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.011)
- Lelong IH, Petegnief V, Rebel G (1992) Neuronal cells mature faster on polyethyleneimine coated plates than on polylysine coated plates. *J Neurosci Res* 32:562–568. doi: [10.1002/jnr.490320411](https://doi.org/10.1002/jnr.490320411)
- Li H, Parisi MG, Toubiana M, Cammarata M, Roch P (2008) Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses. *Fish Shellfish Immunol* 25:143–152
- Magazine HI, Liu Y, Bilfinger TV, Fricchione GL, Stefano GB (1996) Morphine-induced conformational changes in human monocytes, granulocytes, and endothelial cells and in invertebrate immunocytes and microglia are mediated by nitric oxide. *J Immunol* 156(12):4845–4850
- Malagoli D, Casarini L, Sacchi S, Ottaviani E (2007) Stress and immune response in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Fish Shellfish Immunol* 23:171–177
- Novas A, Barcia R, Ramos-Martinez JI (2007) Nitric oxide production by haemocytes from *Mytilus galloprovincialis* shows seasonal variations. *Fish Shellfish Immunol* 23:886–891
- Parisi MG, Li H, Jouvett LB, Dyrzynda EA, Parrinello N, Cammarata M, Roch P (2008) Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria. *Fish Shellfish Immunol* 25:834–840
- Philipp EE, Kraemer L, Melzner F, Poustka AJ, Thieme S, Findeisen U, Schreiber S, Rosenstiel P (2012) Massively parallel RNA sequencing identifies a complex immune gene repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. *PLoS ONE* 7:e33091. doi:[10.1371/journal.pone.0033091](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033091)
- Ponder W, Lindberg D (2008) Chap. 1. In: Ponder W, Lindberg D (Eds.) *Phylogeny and evolution of Mollusca*, University of California Press, pp 1–18
- Venier P, Varotto L, Rosani U, Millino C, Celegato B, Bernante F, Lanfranchi G, Novoa B, Roch P, Figueras A, Pallavicini A (2011) Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Genomics* 12:69
- Voccia I, Krzystyniak K, Dunier M, Flipo D, Fournier M (1994) In vitro mercury-related cytotoxicity and functional impairment of the immune cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 29:37–48
- Winston GW, Moore MN, Kirchin MA, Soverchia C (1996) Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, *Mytilus edulis*: lysosomal localization and effect of xenobiotics. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 113:221–229
- Zhang G, Fang X, Guo X, Li L, Luo R, Xu F, Yang P, Zhang L, Wang X, Qi H, Xiong Z, Que H, Xie Y, Holland PW, Paps J, Zhu Y, Wu F, Chen Y, Wang J, Peng C, Meng J, Yang L, Liu J, Wen B, Zhang N, Huang Z, Zhu Q, Feng Y, Mount A, Hedgecock D, Xu Z, Liu Y, Domazet-Lošo T, Du Y, Sun X, Zhang S, Liu B, Cheng P, Jiang X, Li J, Fan D, Wang W, Fu W, Wang T, Wang B, Zhang J, Peng Z, Li Y, Li N, Chen M, He Y, Tan F, Song X, Zheng Q, Huang R, Yang H, Du X, Chen L, Yang M, Gaffney PM, Wang S, Luo L, She Z, Ming Y, Huang W, Huang B, Zhang Y, Qu T, Ni P, Miao G, Wang Q, Steinberg CE, Wang H, Qian L, Liu X, Yin Y (2012) The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490:49–54. doi:[10.1038/nature11413](https://doi.org/10.1038/nature11413)

## The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of *Mytilus edulis* is mediated by an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally inducible in eosinophilic granulocytes.

Rioult, D., Pasquier, J., Boulangé-Leconte, C., Marin, M., Durand, F., Minier, C. & Le Foll, F.

(2013)

Chez les espèces marines et estuariennes, les mécanismes immunotoxiques et/ou immunomodulateurs sont au carrefour des interactions entre les xénobiotiques, les micro-organismes et les variations physico-chimiques de l'environnement. Chez les moules, l'immunité se fonde exclusivement sur les réponses innées menées par des cellules appelées collectivement hémocytes et se trouvant dans le système circulatoire hémolympatique ouvert de ces organismes. Cependant, les hémocytes ne forment pas une population homogène de cellules immunitaires. Différents sous-types de cellules peuvent être distingués par cytochimie, par cytométrie en flux ou par l'analyse de la motilité cellulaire. Des études antérieures ont également montré que ces cellules sont capables d'effluer les xénobiotiques au moyen de l'activité de transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*) conférant un phénotype de résistance multixénobiotique (MXR). Ces transporteurs correspondant à l'ABCB / P-glycoprotéine (P-gp) et à l'ABCC / multirésistance Related Protein (MRP) des vertébrés sont caractérisés chez les *Mytilidae*. Dans ce travail, nous avons étudié les contributions relatives de l'efflux médié par les transporteurs ABCB et ABCC dans les différentes sous-populations d'hémocytes de *Mytilus edulis*, prélevés dans des zones différemment touchées par les contaminants chimiques en Normandie (France). Des analyses par RT-PCR fournissent les preuves de la présence de transporteurs ABCB et ABCC dans le transcriptome des hémocytes. L'immunodétection de l'ABCB / P-gp, avec l'UIC2 comme anticorps monoclonal, dans les hémocytes vivants a révélé que l'expression est restreinte à des structures granulaires dans des cellules étalées. L'activité d'efflux des transporteurs, avec l'utilisation de la calcéine-AM comme sonde fluorescente, a été mesurée par cytométrie en flux et combinée à la mesure précise de la taille des cellules par système Coulter afin d'obtenir une concentration de fluorescence normalisée en fonction du volume cellulaire. Dans ces conditions, les niveaux de fluorescence basale sont plus élevés dans les hémocytes provenant d'Yport (site contrôle) que dans les cellules recueillies sur le port du Havre, où les moules sont plus contaminées par des polluants persistants. En utilisant des bloqueurs spécifique ABCB / P-gp (vérapamil, PSC833, zosuquidar) et ABCC / MRP (MK571), nous montrons que l'activité MXR n'est portée que par les transporteurs de type MRP dans les hémocytes de *Mytilus edulis*. En outre, la détermination des sous-types cellulaires par cytométrie en flux et le calcul du facteur d'activité MXR (MAF) indiquent que l'activité d'efflux ABCC est plus élevée et plus inductible dans les granulocytes éosinophiles que dans les autres sous-types d'hémocytes. Dans l'ensemble, nos résultats montrent que, dans les hémocytes de *Mytilus edulis*, le phénotype MXR est médié par l'activité des transporteurs de type ABCC / MRP principalement exprimés par les granulocytes éosinophiles. Le rôle des transporteurs ABC dans la migration des hémocytes est discuté.

*Aquatic Toxicology*

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.012>

# Mytilus edulis hemocytes MXR phenotype is mediated by an ABCC/MRP-type transporter activity principally supported by eosinophilic granulocytes

2013  
Aquatic Toxicology

Di	P	H	Te	R	I	C
Données initiales	Problèmes	Hypothèses	Tests	Résultats	Interprétations	Conclusions
<p><i>Mytilus</i> sp. exprime des gènes qui codent des transporteurs de types ABCB/P-gp et ABCC/MRP dans les branchies.</p>	<p>Ces transporteurs sont-ils fonctionnellement exprimés dans les hémocytes ?</p>	<p>L'utilisation de l'allocurite fluorescent universel calceïne-AM et de bloqueurs spécifiques ABCB ou ABCC permet de discriminer les transporteurs.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recherche de transcrits en RT-PCR.</li> <li>• Recherche des protéines en WB et immunocytochimie.</li> <li>• Recherche de l'activité d'efflux en présence des bloqueurs ABCB (Vérapamil, Zosuquidar, PSC833) et ABCC (MK571).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les ARNm ABCB et ABCC sont présents dans les hémocytes, à un niveau moindre par rapport aux branchies.</li> <li>• La protéine ABCB semble liée à certains compartiments subcellulaires (pas d'anticorps ABCC).</li> <li>• Aucun effet des bloqueurs ABCB sur l'activité. Seul le MK571 induit une accumulation de fluorescence dans les cellules.</li> </ul>	<p>L'activité d'efflux des cellules est exclusivement due à l'activité d'efflux des transporteurs ABCC.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activité MXR « non-conventionnelle ».</li> <li>• Aucun des tests utilisés ne permet de mesurer une "résistance" aux xénotoxiques.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activité d'efflux des hémocytes de <i>Mytilus edulis</i> est faible voire inexistante.</li> <li>• Les mesures ont été faites sans distinguer les types d'hémocytes.</li> </ul>	<p>L'activité d'efflux est-elle homogène d'un type d'hémocyte à l'autre ?</p>	<p>La cytométrie permet de mesurer séparément l'activité d'efflux des granulocytes éosinophiles, des basophiles et des hyalinoocytes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mesure de la concentration de fluorescence normalisée par le volume couler (FL-FC) pour éviter le biais des différences de tailles cellulaires.</li> <li>• Analyse dans des régions EV/SS déterminées pour différencier les types cellulaires.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La normalisation FL-FC est nécessaire.</li> <li>• Les granulocytes éosinophiles expriment la plus forte activité.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les granulocytes éosinophiles contribuent très majoritairement au phénotype MXR.</li> <li>• Nous proposons de calculer un MAF (MXR Activity Factor)</li> </ul>	<p>Les transporteurs ABCC des hémocytes de <i>M. edulis</i> n'ont peut-être pas pour rôle principal la détoxification.</p>
<p>Le phénotype MXR est induit par certains xénotoxiques des eaux chimiquement contaminées.</p>	<p>Est-il possible de mesurer des variations d'activité d'efflux dans des hémocytes prélevés chez des moules collectées à partir de sites différemment pollués ?</p>	<p>L'utilisation des données de l'IFREMER de contamination des moules permet d'identifier des sites de prélèvement.</p>	<p>Mesures extemporanées à partir d'échantillonnage sur le plateau d'Iport et dans le bassin Vétillard au Havre.</p>	<p>L'activité est différente aussi bien au niveau basal qu'en condition bloquée.</p>	<p>Le phénotype MXR des hémocytes est significativement induit dans des conditions de contamination environnementale.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Le phénotype MXR est inducible.</li> <li>• La question durable, en termes de détoxification, d'un efflux "dans l'hémolymphe" sans polarité ni barrière de perméation reste entière.</li> </ul>
Données post-étude						
Dpe						
Nouveaux Problèmes						
NP ...						



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aquatox](http://www.elsevier.com/locate/aquatox)

## The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of *Mytilus edulis* is mediated an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally inducible in eosinophilic granulocytes

Damien Rioult<sup>a,\*</sup>, Jennifer Pasquier<sup>a</sup>, Céline Boulangé-Lecomte<sup>a</sup>, Agnès Poret<sup>a</sup>,  
Imane Abbas<sup>b</sup>, Matthieu Marin<sup>c</sup>, Christophe Minier<sup>a</sup>, Frank Le Foll<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Ecotoxicology, UPRES EA 3222, IFRMP 23, University of Le Havre, 76058 Le Havre cedex, France

<sup>b</sup> Research and Development Department, Lebanese Atomic Energy Commission – CNRS, Beirut, Lebanon

<sup>c</sup> Laboratoire de Régulation des Signaux de Division, EA 4020, IFR 147, Bât. SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 July 2013

Received in revised form 22 October 2013

Accepted 21 November 2013

#### Keywords:

Mussel blood cells  
Innate immunity  
Flow cytometry  
Cell migration  
MXR

### ABSTRACT

In marine and estuarine species, immunotoxic and/or immunomodulatory mechanisms are the crossroad of interactions between xenobiotics, microorganisms and physicochemical variations of the environment. In mussels, immunity relies exclusively on innate responses carried out by cells collectively called hemocytes and found in the open hemolymphatic circulatory system of these organisms. However, hemocytes do not form a homogenous population of immune cells since distinct subtypes of mussel blood cells can be distinguished by cytochemistry, flow cytometry or cell motility analysis. Previous studies have also shown that these cells are able to efflux xenobiotics by means of ATP binding cassette (ABC) transporter activities conferring a multixenobiotic resistance (MXR) phenotype. ABC transporters corresponding to vertebrate class B/P-glycoprotein (P-gp) and to class C/multidrug resistance related protein (MRP) are characterized in mytilidae. Herein, we have investigated the relative contributions of ABCB- and ABCC-mediated efflux within the different hemocyte subpopulations of *Mytilus edulis* mussels, collected from areas differentially impacted by chemical contaminants in Normandy (France). RT-PCR analyses provide evidence for the presence of ABCB and ABCC transporters transcripts in hemocytes. Immunodetection of ABCB/P-gp with the monoclonal antibody UIC2 in living hemocytes revealed that expression was restricted to granular structures of spread cells. Efflux transporter activities, with calcein-AM as fluorescent probe, were measured by combining flow cytometry to accurate Coulter cell size measurements in order to get a cell-volume normalized fluorescence concentration. In these conditions, basal fluorescence levels were higher in hemocytes originating from Yport (control site) than in cells collected from the harbor of Le Havre, where mussels are more exposed with persistent pollutants. By using specific ABCB/P-gp (verapamil, PSC833, zosuquidar) and ABCC/MRP (MK571) blockers, we show that MXR activity is only carried out by MRP-type transporters in *M. edulis* hemocytes. In addition, cell-type-gated flow cytometry and calculation of the MXR activity factor indicate that ABCC-efflux activity is higher and more inducible in eosinophilic granulocytes than in other hemocyte subtypes. We conclude that, in the hemocytes of *M. edulis*, MXR phenotype is mediated by an ABCC/MRP-type transporter activity principally supported by eosinophilic granulocytes. A role for ABC transporters in hemocyte migration is discussed.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Mytilus edulis* and sister mussel species such as *Mytilus galloprovincialis* or *Mytilus californianus* are bivalves very commonly found in coastal regions. As frequent, sessile and relatively resistant filter-feeders exposed to chemical and biological water

contaminants, these mussels are widely used to monitor biological effects of pollution, especially in estuaries (Bodin et al., 2004; Auffret et al., 2006; Akaishi et al., 2007; Hagger et al., 2008). Unlike oysters and clams, which also represent bivalve molluscs of major ecological and economical interest, mussels are actually not subjected to episodes of massive mortality (Costa et al., 2009). This resistance is probably underlain by a robust immune system eliminating pathogens. Cell detoxification mechanisms expressed by immunocytes may also specifically contribute to maintain the efficiency of immune response in the presence of additional stressors,

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [drioult@free.fr](mailto:drioult@free.fr), [damien.rioult@univ-reims.fr](mailto:damien.rioult@univ-reims.fr) (D. Rioult).

as proposed in whole molluscs ingesting natural toxins (Whalen et al., 2010) or exposed to environmental pollutants (Smital et al., 2003).

In marine invertebrates, immunity relies exclusively on innate responses operated by formed elements of hemolymph, designed as hemocytes. Analyses at the transcriptomic level of *Mytilus* hemocytes, studied as a whole population of cells, revealed expression of a vast repertoire of immune-related genes (Venier et al., 2011; Philipp et al., 2012). These fundamental data undoubtedly confirm the central role of hemocytes as key players of mussel immunity. However, hemocytes are also known as a heterogeneous cell population, since different subtypes have been initially described on the basis of cytomorphological studies in fixed preparations (Moore and Lowe, 1977; Cajaraville and Pal, 1995; Carballal et al., 1997). Recent approaches based on flow cytometry also succeeded in distinguishing various subpopulations (García-García et al., 2008; Parisi et al., 2008; Donaghy and Volety, 2011). By combining flow cytometry, electronic Coulter volume measurements and cell migration analysis on living mussel hemocytes, we have proposed a morphofunctional classification including their motile properties (Le Foll et al., 2010; Rioult et al., 2013).

Among the arsenal of enzymes involved in animal cell detoxification, ATP-fueled pumps lowering cytosolic concentration of xenobiotics in a verapamil-sensitive manner were first described in fresh water bivalves (Kurelec and Pivcevic, 1989) and rapidly identified as responsible for a multi xenobiotic resistance (MXR; Kurelec, 1992), by analogy with the phenotype of induced multi drug resistance (MDR) in tumor cell lines exposed to anti-cancer drugs (Biedler and Riehm, 1970; Kartner et al., 1983). After two decades of study, the MXR phenotype has been many times confirmed in fresh water bivalves, in particular from *Dreissena polymorpha* trochophora and D-shape larvae (Faria et al., 2011; Navarro et al., 2012), adult gill microsomal fractions (Parant and Epel, 2001), dissected gill tissue (Navarro et al., 2012) and whole organisms (Pain and Parant, 2007). In marine mussels, conclusive experiments using MXR pumps fluorescent allocrites, i.e. effluxed ligand (Blight and Holland, 1990; Holland and Blight, 1999), in basal and blocked conditions, have been also extensively conducted in *M. californianus* gill preparations (Cornwall et al., 1995; Eufemia and Epel, 2000; Luckenbach et al., 2004; Luckenbach and Epel, 2005). A major step forward was the cloning, again from gill tissue of *M. californianus*, of two complete sequences coding for ATP binding cassette (ABC) transporters, with high degrees of identity to mammalian MDR transporters of the type ABCB/P-glycoprotein, (P-gp) and of ABCC/MDR-related protein (MRP) (Luckenbach and Epel, 2008). Fragments of ABCB/P-gp (Luedeking and Koehler, 2002) and of ABCC/MRP (Luedeking et al., 2005) mRNAs were also obtained from *M. edulis* and used to measure levels of MXR transcripts in gills, mantle and digestive gland, suggesting that distinct organs or systems, within a same individual, differentially regulate the expression of ABC transporters and, therefore, vary in terms of resistance (or susceptibility) to toxics.

Because ABC transporters as been shown to be modulated, i.e. induced (Smital et al., 2003) or, conversely, inhibited (Luckenbach et al., 2004) in mussels exposed to various xenobiotics, efflux activity is generally proposed as a tool to monitor biological response to environmental pollution (Minier et al., 1999; Bard, 2000; Saez et al., 2008). In the immune system more specifically, the status of the MXR transporters may be indicative of preserved defence against pathogens or of immunotoxic effects, in organisms exposed to potentially harmful compounds. Beside these ecotoxicological considerations, mussel hemocytes represent a valuable model of invertebrate innate immune cells, in which modulatory effects of xenobiotics onto ABC transporters can be assessed. These cells are relatively easy to withdrawn from animals and can be maintained in primary culture for several days (Marin et al., 2004; Rioult

et al., 2013). Previous studies focused on ABC-driven allocrite efflux, under basal and blocked conditions, with a confocal microscope (Minier and Moore, 1996, 1998) or a microplate reader (Marin et al., 2004) revealed MXR transporters activities in whole mussel hemocytes. However, these activities were reported as relatively modest (Svensson et al., 2003; Zaja et al., 2006) when compared to results obtained in gills (Luckenbach and Epel, 2008) or in MDR cell lines studied in the same conditions (Marin et al., 2004). In a recent work, Della Torre et al. (2013) have detected a basal ABCC-mediated efflux activity, increased by exposure to CdCl<sub>2</sub>, in hemocytes of *M. galloprovincialis*. Up to now however, no information concerning expression and inducibility of ABC transport protein within hemocyte subtypes is available. In the absence of available molecular cell marker (García-García et al., 2008; Le Foll et al., 2010), a differential expression of the MXR phenotype among basophiles, hyalinocytes or eosinophilic granulocytes may represent a valuable tool distinguish hemocyte subpopulations and to depict a more comprehensive image of immune cells functions in mussels.

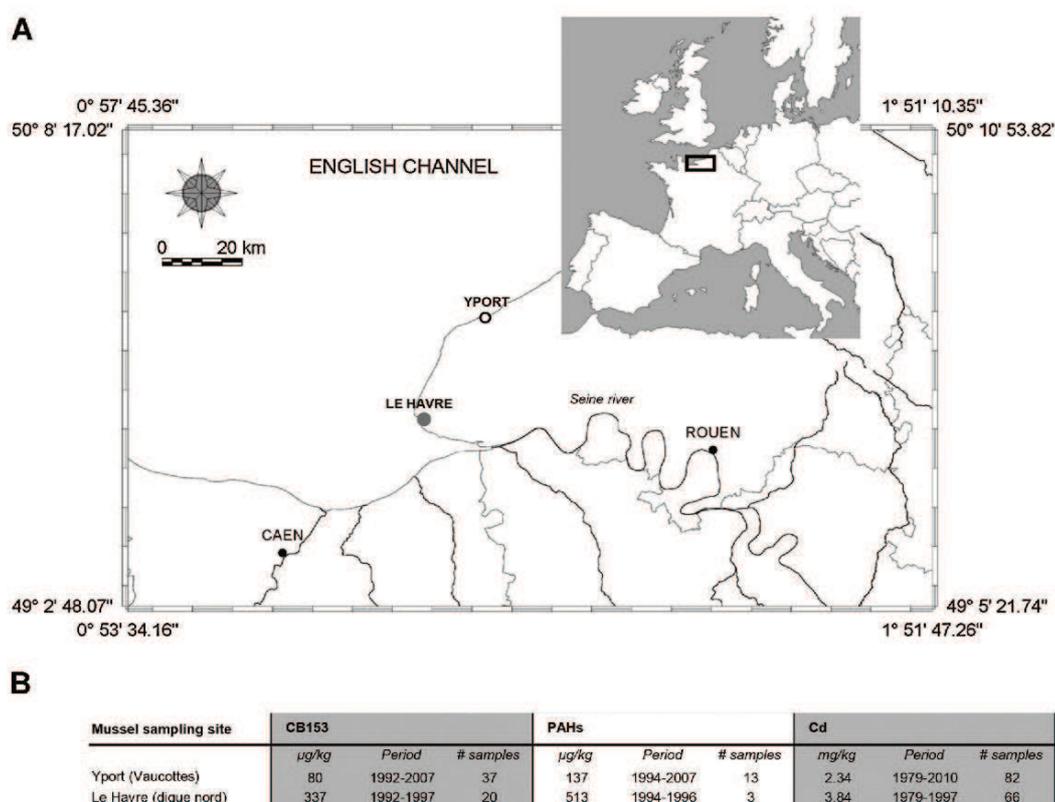
The main objectives of the present study were to determine the relative contributions of ABCB- and ABCC-mediated efflux within the different hemocyte subpopulations. Therefore, we have investigated the expression of ABC transporters in hemocytes. The nature of efflux activity was assessed by using cell-volume normalized fluorescence concentration analyzed in flow cytometry gated for distinct subtypes of *M. edulis* hemocytes in the presence of blockers known for their selectivity toward mammalian ABCB- or ABCC-type activities. Comparison of efflux transport in hemocytes of mussels from distinct sampling sites highly suggests the occurrence of higher MXR activities in cells originating from more contaminated areas. Region-gated flow cytometry and calculation of a MXR activity factor show that ABCC-efflux activity is higher and more inducible in eosinophilic granulocytes than in other hemocyte subtypes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. In situ mussel collection and hemolymph withdrawal

Adult mussels (4–5 cm shell length), *M. edulis*, were collected between December 2009 and February 2010 from two distinct sites (Fig. 1A), on the intertidal rocky shore of Yport, France (49°44' N, 0°18' E) or in the sea harbor of Le Havre, in a subtidal bed of basin Vétillard (49°74' N, 0°31' E). Mussels were transported to the laboratory for immediate analysis. Hemolymph was aseptically withdrawn, in a BSL2 laminar flow cabinet, from the posterior adductor muscle sinus, by gentle aspiration with a 1 mL syringe equipped with a 22G needle. Hemocytes used in MXR activity measurements were withdrawn from 33 (Yport) and 22 (Le Havre) mussels, without hemolymph pooling except for RT-PCR and Western blot detection. Details on origin and number of replicates are specified in figure legends.

The coastal marine environment of Le Havre borders the northern part of the Seine Estuary, a highly contaminated area. Le Havre coastline is located downstream chronic sources of Seine river water contamination, originating from agricultural runoff, major cities waste water sewage (Paris, Rouen, Le Havre) and inputs from several industrial and petrochemical plants. Le Havre is the largest port in west Europe, the second port in northern Europe for chemical products, the first for container trade and for providing fuels in France. The French marine environment monitoring network (Réseau National d'Observation, RNO), created by the Ministry of environment, quantifies chemical contaminants in mussel tissues. Data presented in Fig. 1B are available online at <http://www.ifremer.fr/envlit/>, a website dedicated to coastal environment operated by IFREMER (Institut Français de Recherche pour



**Fig. 1.** Map of La Pointe de Caux (Normandy), the northern part of the Bay of Seine. (A) Two mussel sampling sites were selected as differentially impacted by PCBs, PAHs, and cadmium, in the harbor of Le Havre ● where the animals are highly exposed to xenobiotics and in the rocky shore of Yport ○, less contaminated. Inset: a larger view of the sampling field area. (B) Table presenting mean concentration of contaminants (µg/kg-dry weight) in mussel tissues as determined by the French marine environment monitoring network (RNO) and available at <http://www.ifremer.fr/envlit/>, a website dedicated to coastal environment operated by IFREMER. See Section 2 for details.

l'Exploitation de la MER), and indicate mussel mean contamination with the polychlorobiphenyl congener CB153, cadmium and various polycyclic aromatic hydrocarbons, over periods covering 1979–2010, from sampling stations corresponding the rocky shore of Yport (Vaucottes) and embankments in the harbor of Le Havre.

## 2.2. Analysis of MXR activity by flow cytometry

To assess MXR activity, freshly withdrawn hemocytes were loaded with 0.25 µM calcein acetoxy-methylester (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) by incubation for 30 min at 20 °C in the dark in 0.2 mm filtered marine physiological saline solution (MPSS) containing: NaCl 470 mM, KCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Hepes 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 47.7 mM, pH 7.8 (Hernroth, 2003). Calcein-AM is a non-fluorescent, membrane-permeant probe effluxed by both ABCB/P-gp and ABCC/MRP transporters (Legrand et al., 1998). In the cytosol, the acetoxy-methylester group is cleaved by non-specific intracellular esterases, releasing the fluorescent and non-permeant dye calcein into the cells that accumulate the probe. As a result, the fluorescence intensity is inversely related to the activity of ABCB- and ABCC-transporters. The fluorescent light (FL) was quantified using a Cell Lab Quanta SC MPL flow cytometer (Beckman Coulter) equipped with a 22-mW 488-nm excitation laser. Voltage settings of photomultipliers were not modified throughout the experiments (Pasquier et al., 2012). Marine Isodiluent of seawater osmolality was used as sheath fluid. The cytometer was operated at a flow rate of 30 mL/min. Particle sizes were accurately determined by using the Coulter-type electronic volume (EV) channel of the cytometer, after calibration with 10-µm FlowCheck microspheres (Le Foll et al., 2010). Each analysis consisted in a record of 20 000 events,

triggered on electronic volume (EV) as primary parameter, according to a particle diameter exceeding 5.5 µm. Green FL was quantified via the FL1 channel (log scale) through a 525-nm band pass filter. The normalized intracellular fluorescence concentration (FL1-FC, arbitrary units) was calculated from the ratio of FL1 to EV (Thomas et al., 2001). Mean values of FL1-FC, independent of the size of cells, were plotted and compared. A MXR activity factor (MAF) was calculated (Hollo et al., 1994) using the following formula:

$$\text{MAF} = 100 * \left( \frac{\text{MFL1-FC}_{\text{CTRL}} - \text{MFL1-FC}_{\text{MK10}}}{\text{MFL1-FC}_{\text{MK10}}} \right)$$

wherein MFL1-FC<sub>CTRL</sub> and MFL1-FC<sub>MK10</sub> are the mean normalized fluorescence concentrations measured the absence and presence of MK571 (10 µM).

## 2.3. RT-PCR

Total RNA was extracted from both gills and total hemolymph of 5 mussels collected on the shore of Yport. The extractions were performed using the RNeasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations. After genomic DNA removal (Turbo DNA free kit, Ambion, Courtaboeuf, France), total RNA (1 µg) was reverse transcribed with oligodT (Promega, Charbonnières, France) using the Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). PCR analysis was performed with a MasterCycler apparatus (Eppendorf, Le Pecq, France) from 2 µL of cDNA. ABCB was amplified using the 5'-CAGAGTTCTATGACCCAGATGCAG-3' (forward) and 5'-GTTCTACTCTCAGAGTCTAATGCAG-3' (reverse) primers

(Luedeking and Koehler, 2004). ABCC (Genbank accession number AF397143) and  $\beta$ -actin (unpublished sequence) primers were designed using the Primer3 software (Rozen and Skaletsky, 2000). The sequences were 5'-ACATTGGACAGCCCTCAAC-3' (forward) and 5'-AAATTGTCGGTGAGTCGAA-3' (reverse) for ABCC, and 5'-AGTTGTGCCCTTCTCATG-3' (forward) and 5'-ATTCTCTTTCGGTGTGGTTG-3' (reverse) for  $\beta$ -actin. Theoretical amplicon lengths for ABCB, ABCC and  $\beta$ -actin were, respectively, 381 bp, 349 bp and 123 bp. After an initial denaturation step at 94 °C for 2 min, 35 cycles were performed including a denaturation step at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s. The final extension step was continued for 5 min.  $\beta$ -actin amplification was used as a qualitative control. DNA was omitted in non-template control (NTC). The absence of gDNA traces in RNA samples was checked by performing amplification from RNA without previous reverse-transcription. PCR products were analyzed on a 1% agarose gel and visualized by SYBR staining (SYBR Safe DNA gel stain, Invitrogen). Amplicon lengths were evaluated using a standard molecular weight marker (100 bp DNA ladder, Promega).

#### 2.4. Protein extraction and Western blot analysis

Hemocytes in total hemolymph or sample pieces of gills were lysed in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 0.1% Triton X-100, 0.15 mM KCl, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1.3 mM EDTA and 2  $\mu$ M aprotinin. Protein lysates were placed on ice for 30 min, vortexed every 5 min, and cleared by centrifugation at 3500 g for 15 min at 4 °C. The supernatants were collected and frozen at -80 °C until analysis. Protein concentration in extracts was determined using the Bradford method. Aliquots (20  $\mu$ g) of total proteins were subjected to electrophoresis through a 9% SDS-polyacrylamide gel (stacking gel 5%) at a constant voltage of 90 V (25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 192 mM glycine, and 0.1% SDS running buffer). 10  $\mu$ L of Rainbow molecular weight marker (Amersham) was also migrated. Proteins were then transferred to Hybond C nitrocellulose membrane (Amersham) overnight at 120 mA current using a 25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 150 mM glycine, and 5% (v/v) methanol transfer buffer. The nitrocellulose membranes were blocked with 5% BSA in 1 Tris-buffered saline (TBS) (20 mM Tris (pH 7.6), 137 mM NaCl) for 2 h. Immunostaining was carried out using a mammalian P-gp C219 monoclonal antibody (AbCys) at 0.5 mg/mL in TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.6), 0.05% Tween, 1% BSA for 2 h at room temperature and a secondary polyclonal anti-mouse IgG antibody diluted to 1y1500 (Sigma) for 1 h. Revelation was performed with bromochloro-indolyl-phosphate and nitro-blue-Tetrazolium in alkaline phosphatase buffer. Western blot were realized in pooling 5 mussels coming from Yport.

#### 2.5. Confocal microscopy

For immunostaining of ABCB proteins, hemocytes were withdrawn from mussels freshly collected from Yport. One droplet of hemolymph was deposited in 35-mm glass bottom culture dishes (Mattek, Ashland, MA) for subsequent live-cell microscopy. Labeling of P-gp was performed on living hemocytes by direct staining for 30 min at 20 °C with a phycoerythrin (PE)-conjugated UIC2 monoclonal antibody solution (1 mg/mL, Beckman Coulter, Villepinte, France) diluted 50:50 with MPSS 2X. An isotype IgG2a antibody was used to control for unspecific binding and fluorescence. Nuclei were then counterstained with Hoechst 33342 (10  $\mu$ M) in MPSS for 30 min. After staining, cells were washed 3 times in MPSS. Imaging was performed using a Olympus FV10i-LIV automated confocal microscope (Olympus France S.A.S., Rungis, France) at 405 and 635 nm with a 60 $\times$  phase contrast water

immersion objective NA 1.2. Post-acquisition image analysis was performed with FV10-ASW 3.1 (Olympus).

#### 2.6. Statistical analysis

All quantitative data were expressed as mean  $\pm$  standard error. Statistical analysis was performed by using SigmaPlot 11 (Systat Software Inc., Chicago, IL). A Shapiro-Wilk normality test, with a  $p = 0.05$  rejection value, was used to test normal distribution of data prior further analysis. All pairwise multiple comparisons were performed by one way ANOVA followed by Holm-Sidak post hoc tests for data with normal distribution or by Kruskal-Wallis analysis of variance on ranks followed by Tukey post hoc tests, in case of failed normality test. Paired comparisons were performed by Student's  $t$ -tests or by Mann-Whitney rank sum tests in case of unequal variance. Statistical significance was accepted for \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  or \*\*\* $p < 0.001$ . For the purpose of IC<sub>50</sub> value calculation (MK571 dose-response curves of calcein-AM assay), data were fitted to a sigmoidal three parameters dose-response model:

$$y = b + \frac{a - b}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x)}}$$

where  $y$  is response, i.e. the ratio of mean FL1-FC in the presence of MK571 to mean FL1-FC in control condition,  $b$  represents minimum of response,  $a$  represents maximum of response  $E_{max}$ ,  $x$  is logarithm of MK571 concentration and IC<sub>50</sub> (or EC<sub>50</sub>) is the concentration of inhibitor that corresponds to 50% of maximal effect.

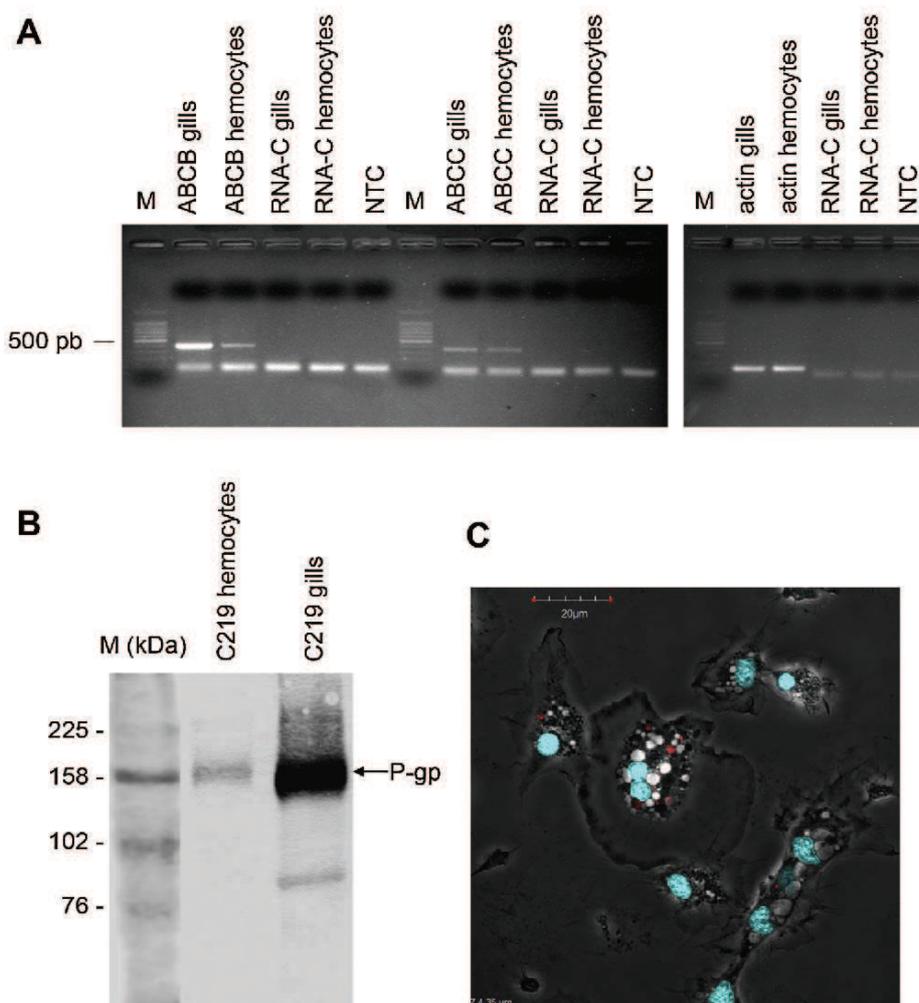
### 3. Results

#### 3.1. Identification of ABC gene products from *M. edulis* hemocytes

Mussels collected from the site of Yport were used to identify ABC gene products. The expression of ABCB/P-gp and ABCC/MRP transporters was investigated in gill and hemocyte extracts by RT-PCR. As shown in SYBR-stained agarose gels of Fig. 2A, PCR products presenting the expected lengths, i.e. 381 and 349 bp for ABCB/P-gp and ABCC/MRP respectively, were found. Semi-quantitative analysis indicates that gills expressed a higher level of ABCB transcripts by comparison to hemocytes. Moreover, ABCC cDNAs were detected at lower levels than their ABCB counterparts in both tissues. Immunodetection of P-gp-like transporter proteins was assayed because mussel ABCB amino acid sequence contains the VQEALD epitope of c219 monoclonal antibody (Luckenbach and Epel, 2008). Western blot analysis (Fig. 2B) reveals an intense immunolabeling at the apparent molecular weight of P-glycoprotein (170 kDa) in gills and a corresponding less intense but detectable immunoreactive band in total hemocyte extracts. For localization of ABCB proteins, indirect C219 immunocytochemistry was used in permeabilized and fixed hemocytes preparations, without success (data not shown). Living hemocytes were then labeled by direct staining with a phycoerythrin (PE)-conjugated UIC2 monoclonal antibody. UIC2 is a conformation-sensitive mouse antibody directed against an external epitope of human P-glycoprotein (Zhou et al., 1999; Pasquier et al., 2012). Large spots of antibody staining restricted to granular structures were observed in spread hemocytes (Fig. 3C). These structures were closely associated to plasma membrane and moved as hemocytes changed of morphology and migrated (Supplementary videos 1 and 2).

#### 3.2. Effect of blockers on calcein-acetoxymethyl ester efflux activities in mussel whole blood cells

Efflux activity of non-sorted living hemocyte suspensions was investigated by using flow cytometry with calcein-acetoxymethyl



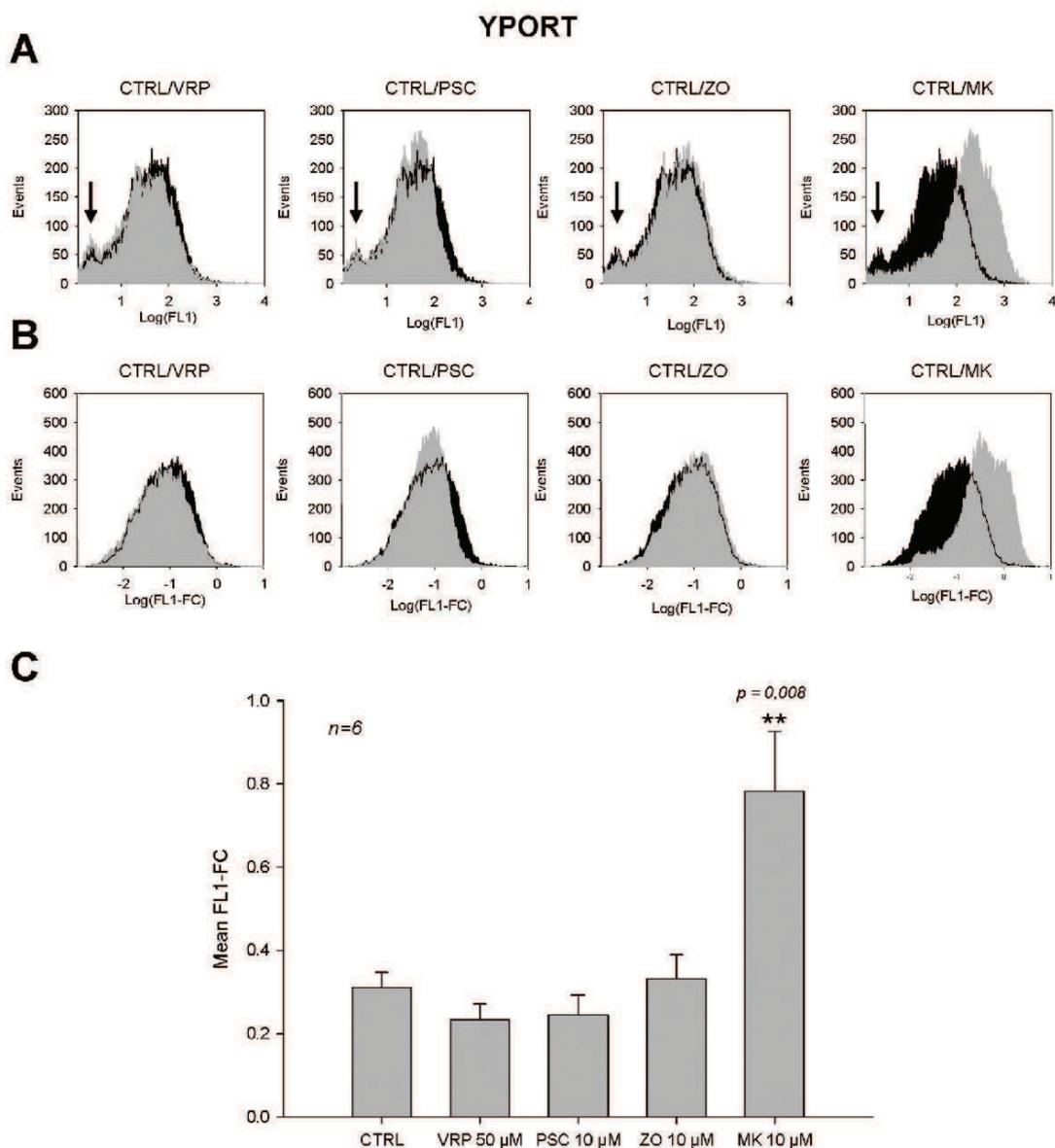
**Fig. 2.** Detection of ABCB and ABCC transporters in mussel gills and hemocytes. (A) ABCB/P-gp and ABCC/MRP cDNA detection by RT-PCR. Total RNA was extracted from gills and hemolymph, reverse-transcribed and target sequences were amplified by using specific primers. Lack of genomic DNA in samples was checked by amplification from total RNA (RNA-C lanes). As a negative control, cDNA was omitted in non-template control (NTC lanes).  $\beta$ -actin was amplified as a qualitative control. Amplicon length was evaluated using a standard molecular weight marker (M). (B) Western blot detection of ABCB/P-gp in hemocyte protein extracts, separated by 8% SDS-PAGE and probed with the monoclonal antibody C219. Lane 1, sample from total hemocytes; lane 2, sample from gills. A molecular weight ladder is shown to the left. (C) P-gp was immunodetected with phycoerythrin-conjugated (PE)-UIC2 mAb (red fluorescence) by confocal laser scanning. Phase contrast image and nuclei stained with Hoechst 33342 (blue fluorescence) are superimposed. Note that the anti-P-gp immunostaining was restricted to intracellular granules. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

ester (C-AM) as MXR pumps allocrite, *i.e.* effluxed ligand (Blight and Holland, 1990; Holland and Blight, 1999). C-AM is a non-fluorescent membrane permeant probe which is actively transported by both ABCB/P-gp and ABCC/MRP proteins (Legrand et al., 1998). Thus, cells with less efflux activity accumulate the probe, cleave the acetomethoxy group and retain the fluorescent dye calcein into the cytosol. To distinguish between activities, cells were treated with pharmacological blockers characterized by their specificity for mammal ABCB- or ABCC-transporters. Verapamil is a well-known competitive inhibitor of the ABCB efflux protein (Ferry et al., 1992). PSC833 (Pourtier-Manzanedo et al., 1992) and zosuquidar (Shepard et al., 2003) are non-competitive blockers of the ABCB transporter. MK571 is a blocker with high specificity for ABCC-pumps (Olson et al., 2001).

To assess C-AM efflux activity of hemocytes withdrawn from mussels sampled from the less contaminated site (Yport), distributions of fluorescence accumulation in control cell populations were superimposed to fluorescence of cells treated for 30 min with the blockers of ABC transporters (Fig. 3). As shown in Fig. 3A,

fluorescence of hemocytes in control conditions did not differ from fluorescence of cells exposed to verapamil (50  $\mu$ M), PSC833 (10  $\mu$ M) or zosuquidar (10  $\mu$ M). Conversely, in hemocytes exposed to MK571 (10  $\mu$ M), the peak of fluorescence was shifted to the right, toward regions of lower efflux, revealing an inhibition of MXR activity.

In these experiments, however, fluorescence distributions were obvious non-homogeneous, characterized by a main set of cells with relatively high fluorescence levels and a subset of hemocytes peaking at lower intensities (arrows in Fig. 3). *M. edulis* hemolymph comprises several hemocyte subtypes that are especially distinguished by their sizes (Le Foll et al., 2010). In such heterogeneous cell population, even loaded with a fluorescent probe at a unique concentration, differences in hemocyte volumes influence quantitative analyses, small cells providing less light than larger ones. To overcome this artifactual dispersion of measurements, fluorescence intensity (FL1) was normalized as fluorescence concentration (FL1-FC), a ratio of FL1 to accurate cell sizing by Coulter-type electronic volume (EV) determination (Thomas et al., 2001). In

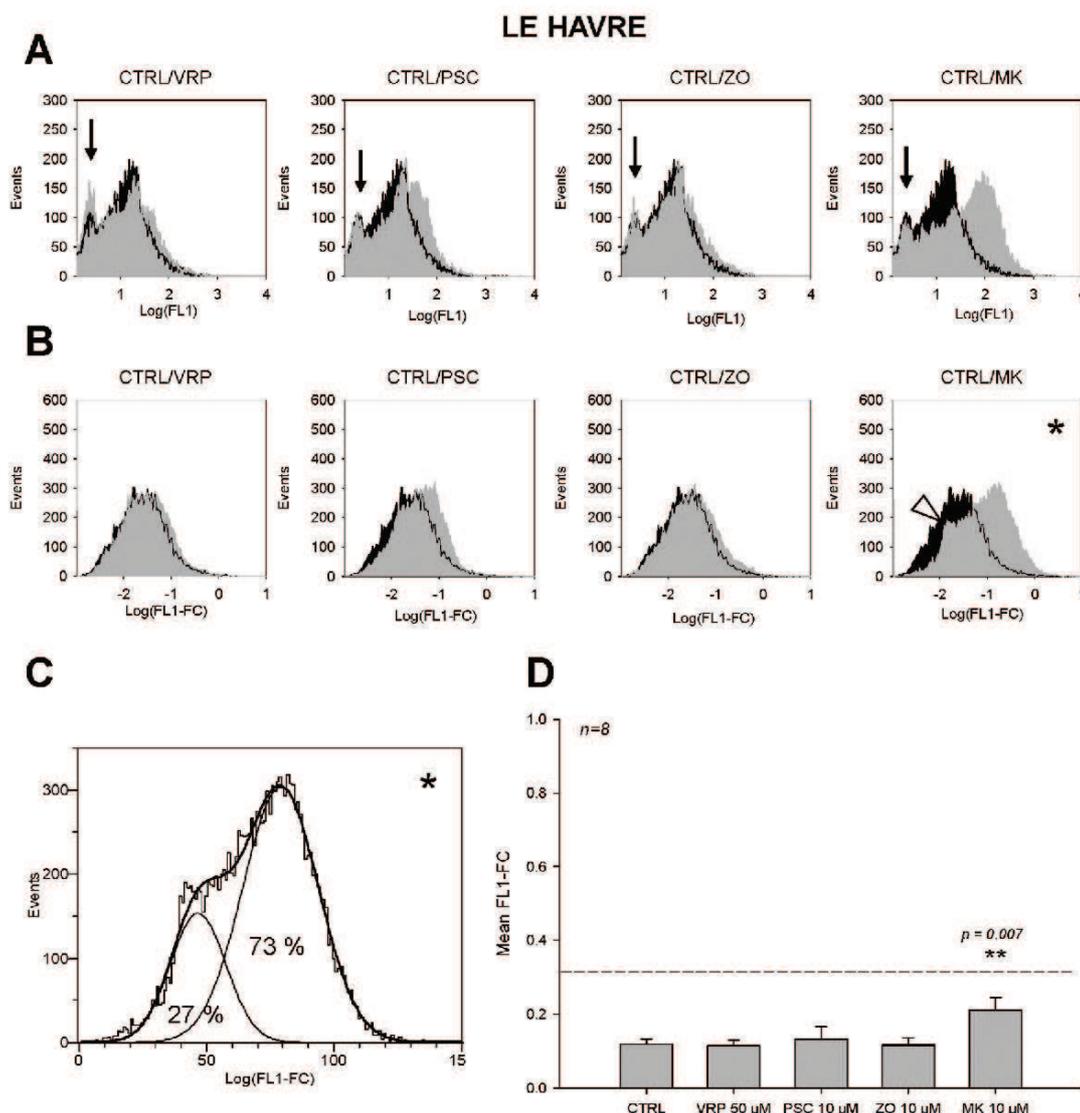


**Fig. 3.** Flow cytometry analysis of MXR efflux activity in total hemocytes from mussels sampled in Yport. MXR activity was quantified by analyzing fluorescence of a cell population loaded with calcein-AM (incubation time 30 min) in control condition or after treatment (30 min) with various blockers used in vertebrates for their specificity toward ABCB/P-gp (Verapamil 50  $\mu$ M, VRP; PSC833 10  $\mu$ M, PSC; Zosuquidar 10  $\mu$ M, ZO) or ABCC/MRP (MK571 10  $\mu$ M, MK) activities. (A) Raw fluorescence of a representative sample measured in the FL1 channel of the flow cytometer. Results in the presence of blockers (solid gray histogram) are superimposed to control response (solid black histogram). Non-homogeneous fluorescence distributions are indicated by arrows. (B) Normalized fluorescence (FL1-FC, for FL1-fluorescence concentration) distributions of the sample presented in (A) expressed as the ratio of FL1 to cell size, determined for each cell by Coulter-type electronic volume analysis. Note the regular bell-shaped distributions revealing responses independent to cell sizes. (C) Mean basal fluorescence of total hemocytes collected from mussels sampled in Yport, expressed as cell fluorescence concentration FL1-FC, in the absence (CTRL) or the presence of ABC transporters blockers. MK571 was the only inhibitor that significantly increased FL1-FC. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of 6 independent analyses. Results significantly different from control are indicated (\*\* $p < 0.01$ , Mann-Whitney rank sum test).

these conditions, size normalized FL1-FC distributions were found homogeneous among whole hemocytes (Fig. 3B). The mean levels of FL1-FC significantly increased from  $0.311 \pm 0.036$  in control to  $0.782 \pm 0.145$  (arbitrary units a.u.,  $n=6$ ) after exposure to MK571. Subsequently, FL1-FC quantification of MXR efflux activity was used throughout the study.

In hemocytes collected from mussels of more contaminated locations (Le Havre), again, FL1 distributions appeared as bimodal with subsets of cells peaking in the first and in the second decade (Fig. 4A). Exposure to ABCC blocker MK571 provoked an increase of

raw fluorescence. Normalized FL1-FC distributions were well bell-shaped and shifted to higher values in the presence of MK571. In representative single parameter histograms of Fig. 4B and C, however, a minor cell group was detected with less calcein accumulation in response to MK571 (arrow heads). This suggests the occurrence of distinct hemocyte subpopulations with differential sensitivities to MK571 and, thus, distinct efflux activities. To quantify cell counts in each population, the analyzed events were fitted by two a sum of Gaussian distributions. Fitting parameters indicates that MK571 had weaker effects in 27% of hemocytes and stronger



**Fig. 4.** Flow cytometry analysis of MXR efflux activity in total hemocytes from mussels sampled in Le Havre. MXR activity and effects of blockers were quantified as in Fig. 3. (A) Raw fluorescence of a representative sample measured in the FL1 channel of the flow cytometer. Results in the presence of blockers (solid gray histogram) are superimposed to control response (solid black histogram). Non-homogeneous fluorescence distributions are indicated by arrows. (B) Normalized FL1-FC distributions of the sample presented in (A) expressed as the ratio of FL1 to cell size. Note the presence of an additional peak (arrow head) in the histogram corresponding to the fluorescence increase due to MK571 (\*), revealing the occurrence of distinct cell populations with different cytosolic fluorescence concentrations. (C) FL1-FC response to MK571 in B was fitted with the sum of two Gaussian distributions (bold line). Areas under the curves indicate that the less responding population to MK571 corresponds to 27%, whereas the best responding population forms 73% of total mussel hemocytes. (D) Mean basal fluorescence of total hemocytes collected from mussels sampled in Le Havre, expressed as cell fluorescence concentration FL1-FC, in the absence (CTRL) or the presence of ABC transporters blockers. MK571 was the only inhibitor that significantly increased FL1-FC. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of 8 independent analyses. The dashed line corresponds to the control level of Fig. 3C. Results significantly different from control are indicated (\*\* $p < 0.01$ , t test).

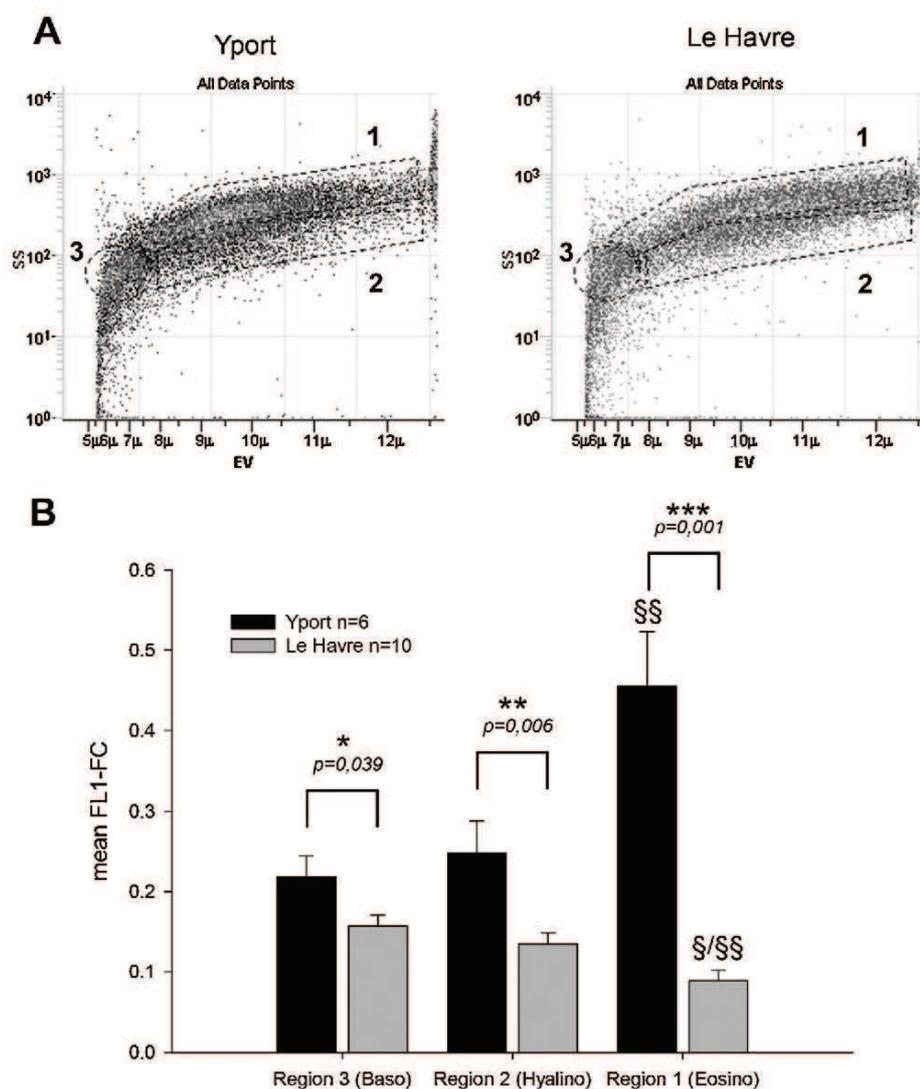
inhibited 73% of them (Fig. 4C). In mussel hemocytes collected from Le Havre, basal FL1-FC was very low,  $0.118 \pm 0.14$  a.u. in control conditions, a value different from normalized fluorescence measured in mussel hemocytes from Yport ( $p < 0.001$ , Mann-Whitney rank sum test, Yport basal FL1-FC corresponding to the dashed line in Fig. 4D). All together, only MK571 significantly increased FL1-FC, with values rising to  $0.211 \pm 0.033$  a.u. ( $n = 8$ ).

### 3.3. Analysis of ABCC-driven efflux activities in scatter plots software gated for hemocyte subpopulations

To investigate MXR activity within the different hemocyte subtypes, C-AM loaded hemocytes were analyzed according criteria

of cell size (EV expressed in  $\mu\text{m}$ ) and inner complexity (side-scatter signal). The gating strategy for differential analysis of the hemocyte subpopulations was based on the definition of three non-overlapping regions on EV/SS dot plots, as proposed in a previous work (Le Foll et al., 2010). According to this study, region R1 was related to eosinophilic granulocytes, region R2 to hyalinocytes and region R3 to basophils. Corresponding representative dot plots obtained from hemocytes withdrawn from mussels sampled in the sites of Yport and Le Havre are shown Fig. 5A. Results indicate that mean basal allocrite concentration, expressed as cell calcein fluorescence concentration FL1-FC, was always significantly lower in mussel hemocytes from Le Havre than in hemocytes from Yport (Fig. 5B), independently of cell subtypes. In addition,

Please cite this article in press as: Rioult, D., et al., The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of *Mytilus edulis* is mediated an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally inducible in eosinophilic granulocytes. Aquat. Toxicol. (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.012>



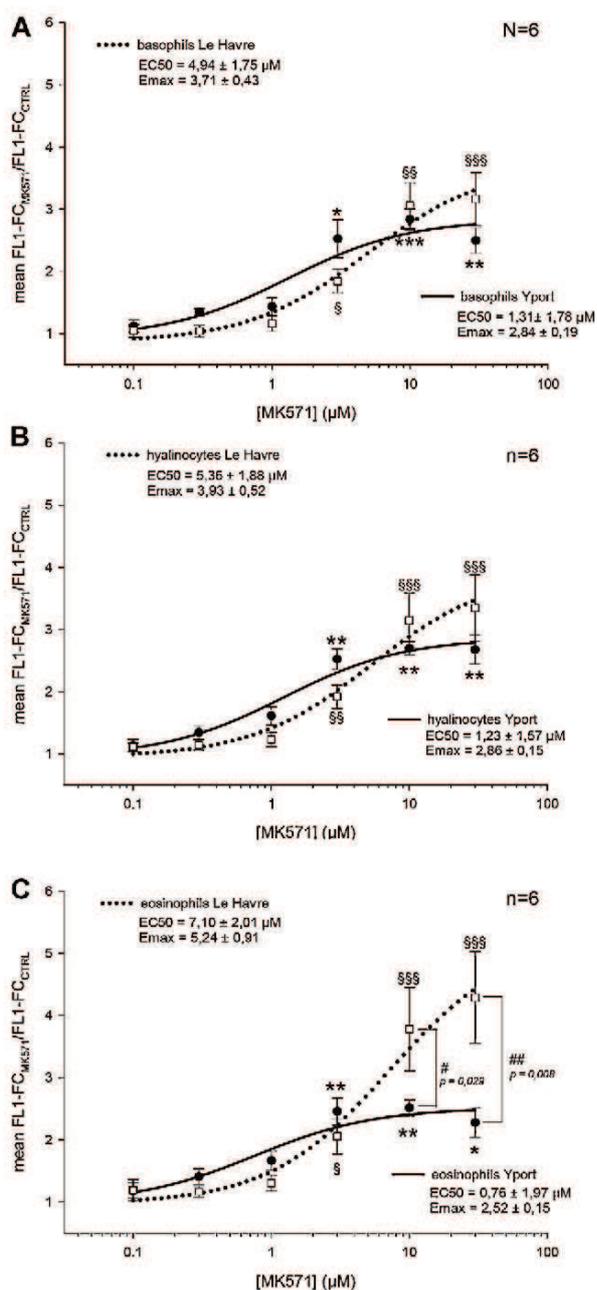
**Fig. 5.** Mean basal allocrite concentration in hemocyte subpopulations. (A) All events density dot plots of cell Coulter-type electronic volume (EV), expressed as cell diameter ( $\mu\text{m}$ ), graphed versus cell complexity side-scatter in log scale (SS). The cytometer was triggered on particle diameters exceeding  $5.5 \mu\text{m}$ . Three subpopulations of interest have been delimited by off-line analysis, numbered 1, 2 and 3 and considered to correspond to eosinophilic granulocytes, hyalinocytes and basophils, respectively. Hemolymph was withdrawn from the posterior adductor muscle of single mussels sampled in the site of Yport (left) or Le Havre (right). (B) Histogram comparing mean basal allocrite concentrations, expressed as cell calcein fluorescence concentration FL1-FC, in eosinophilic granulocytes, hyalinocytes and basophils analyzed from mussels collected in Yport (black bars) or in Le Havre (gray bars). Each point represents the mean  $\pm$  SEM of independent analyses. Significant differences between distinct hemocyte subpopulations within a sampling site are indicated ( $^{\$}p < 0.05$ ,  $^{\$\$}p < 0.01$ , one way ANOVA) and also differences between identical hemocytes subtypes analyzed from distinct sites ( $^*p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ ,  $^{***}p < 0.001$ ,  $t$  test).

site-restricted comparisons between hemocytes subtypes revealed that eosinophilic granulocytes retained more calcein than other hemocytes populations from Yport. By contrast, eosinophilic granulocytes from Le Havre effluxed more fluorescence than other types. As a consequence, the more pronounced difference in basal cell calcein content was detected by comparing mussel eosinophilic granulocytes originating from Yport to their counterpart from Le Havre. This observation can be accounted for by an increase of MXR activity in this cell subtype.

To address this issue, MK571 dose response relationships were established by analyzing FL1-FC among R1, R2 and R3 regions in cells treated with concentrations of blocker rising from  $0.1$  to  $30 \mu\text{M}$  (Fig. 6). Whatever was the origin of mussels, *i.e.* Yport or Le Havre, concentrations of MK571 superior or equal to  $3 \mu\text{M}$  significantly increased mean FL1-FC relatively to control, for all hemocyte subtypes. Half-maximum effective concentrations computed from

dose response curves were in the micromolar range, with values of  $1.31 \pm 1.78 \mu\text{M}$ ,  $1.23 \pm 1.57 \mu\text{M}$  and  $0.76 \pm 1.97 \mu\text{M}$  ( $n = 6$ ) for basophils, hyalinocytes and eosinophils from Yport, respectively. Hemocytes collected from mussel sampled from the harbor of Le Havre responded to MK571 with  $\text{EC}_{50}$  values slightly augmented to  $4.94 \pm 1.75 \mu\text{M}$ ,  $5.36 \pm 1.88 \mu\text{M}$  and  $7.10 \pm 2.01 \mu\text{M}$ , for basophils, hyalinocytes and eosinophils, respectively. No significant variations in MK571 efficacies were pointed out between Yport and Le Havre for basophils and hyalinocytes (Fig. 6A and B). However, at  $10$  and  $30 \mu\text{M}$ , MK571 provoked a much more increased accumulation of calcein ( $E_{\text{max}}$ ) in eosinophils from Le Havre than in equivalent hemocytes from Yport.

All together, eosinophilic granulocytes withdrawn from mussels originating from a highly contaminated area were characterized by a low basal MXR allocrite level together with a high responsiveness to the mammalian ABCC-blocker MK571. The MXR activity



**Fig. 6.** ABCC/MRP selective blocker MK571 dose–response curves in hemocyte subpopulations. Semi-logarithmic dose–response curve showing the effect of increasing MK571 concentrations on (0.1–30  $\mu$ M) on calcein accumulation in mussel hemocytes from Yport (filled circles) and eosinophils from Le Havre (open squares). Analyses were performed separately for basophils (A), hyalinocytes (B) and eosinophils (C). Each point represents means  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ) of the fluorescence concentration increase, expressed as the ratio of the measured FL1-FC in presence of MK571 to the basal FL1-FC in control conditions. Results significantly different from control are indicated for the site of Yport (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ,  $t$  test) and for the site of Le Havre (§ $p < 0.05$ , §§ $p < 0.01$ , §§§ $p < 0.001$ ,  $t$  test). Significant differences obtained with identical MK571 concentrations in eosinophils from distinct sampling sites are also indicated (# $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ,  $t$  test). Ligand binding sigmoidal dose–response curves were fitted to the data to obtain MK571 potency (half-maximal effective concentration,  $EC_{50}$ ) and efficacy (maximum response,  $E_{max}$ ).

**Table 1**

Comparison of MXR activity factors (MAF). MXR activity factors, calculated from gated regions of EV/SS scatter plots, are expressed as mean values  $\pm$  SEM for *M. edulis* hemocytes of Yport or Le Havre origins ( $n = 6-10$ ).

	Yport	Le Havre
R1 eosinophilic granulocytes	59.6 $\pm$ 2.2	72.4 $\pm$ 3.2
R2 hyalinocytes	62.7 $\pm$ 1.3	62.8 $\pm$ 4.7
R3 basophils	64.1 $\pm$ 2.2	61.1 $\pm$ 6.1

factor (MAF) was computed to express the gain of efflux activity in basal condition by comparison to fluorescence accumulation in the presence of blocker. MAF was shown to be correlated to ABC transporters activity (Hollo et al., 1994; Lebedeva et al., 2011). As shown in Table 1, only eosinophilic granulocytes of region R1 exhibited an increased MAF, when hemocytes originating from Le Havre are compared to cells collected from mussels sampled in Yport.

#### 4. Discussion

In this report, by combining flow cytometry to accurate Coulter cell size measurements, we determined cell-volume normalized C-AM efflux activities in hemocytes freshly collected from *M. edulis* organisms originating from different sampling sites. Investigations upon relative contributions of type B and type C ATP binding cassette transporters by exposure to mammalian prototypic pharmacological blockers reveal the only role of ABCC pumps in fluorescent dye efflux, whereas both transcripts and ABCB-like proteins were detected in hemolymph extracts. Furthermore, our data also indicate that ABCC/MRP-driven MXR phenotype varies according to mussel collection areas and is not homogeneously distributed among hemocyte subpopulations. Basal cell calcein concentration was lower in eosinophilic granulocytes from polluted mussel beds and also more augmented by the archetypal ABCC blocker MK571, giving an increased MXR activity factor, by comparison to other hemocyte subtypes.

##### 4.1. Expression of ABC transporters in hemocytes of *M. edulis*

In mussels of the genus *Mytilus*, at least two orthologs of ATP binding cassette transporters genes have been identified on the basis of homologies in amino acid sequences obtained from complete transcripts or fragmental mRNAs (Luedeking and Koehler, 2002; Luedeking et al., 2005; Luckenbach and Epel, 2008). In addition, levels of transcripts have been quantified, from animals of different origins and under various environmental conditions, in gills, digestive gland, mantle and posterior adductor muscle (Luedeking and Koehler, 2002, 2004; Luedeking et al., 2005). In the present work, we found that both ABCB/P-gp and ABCC/MRP mRNAs are also transcribed in hemocytes of *M. edulis*, but at lower levels than in gills. This finding is in excellent accordance with recent results reporting similar relative abundance of ABCB and ABCC transcripts in hemocytes and gills of *M. galloprovincialis* (Della Torre et al., 2013). Moreover, small amounts of ABCB-like proteins were discovered in total hemocyte lysates by using c219 as monoclonal anti-P-glycoprotein antibody, while a massive expression was detected from gills extracts. Localization of ABCB/P-gp transporter proteins in permeabilized and fixed hemocytes appeared unsuccessful when c219 indirect immunocytochemistry was used. By contrast, a singular immunolabeling emerged in some spread living hemocytes probed with a phycoerythrin-conjugated monoclonal UIC2 antibody specifically directed against an extracellular loop of human P-glycoprotein (Zhou et al., 1999; Pasquier et al., 2012). UIC2 staining was clearly restricted to cell membrane areas that face perinuclear vesicular structures and were in motion with autonomous cytoplasmic streaming. This confined

staining could be related to functions for mussel hemocyte ABCB transporters in diverse allocrite sequestration, exchange or efflux from intracellular organelles such as granules, peroxisomes or lysosomes as described in other immune cell types from various organisms (Chapuy et al., 2008; Morita and Imanaka, 2012; Shipp and Hamdoun, 2012). In that case, ABCB/P-gp activity may not directly contribute to the decrease of intracellular content in allocrite by efflux transport from cytosol to extracellular space and, therefore, may not be monitored by fluorescent methods. The lack of antibodies for mussel ABC transporters clearly limits extensive immunocytological studies of subcellular expression compartments.

#### 4.2. Calcein-AM efflux transport activities

Estimation of the activity of ABC transporters cannot be achieved or deduced from non-functional methods, such as Northern blotting, RNA *in situ* hybridization, RT-PCR or immunostaining. Transcripts are often present below the detection threshold and relatively few active transporter molecules can cause major alterations in drug transport (Lebedeva et al., 2011). Moreover, activity of ABC transporters is often not correlated with their expression levels (Beck et al., 1996), since functional efflux transport are largely influenced by membrane lipid microdomains (Urbatsch and Senior, 1995), protein phosphorylation state (Stolarczyk et al., 2011) or intracellular targeting (Fu et al., 2004).

Herein and for the first time in bivalve molluscs, we have used flow cytometry to investigate efflux of C-AM, a pro-fluorescent allocrite of both ABCB/P-gp and ABCC/MRP transporters (Legrand et al., 1998), in suspensions of mono-dispersed and non-sorted hemocytes. Fluorescence in single-parameter histograms appeared to be widely dispersed over three decades, indicating substantial cell to cell variations in calcein content. In particular, two peaks, corresponding to a low and a high calcein quantity, were obtained. Indeed, *M. edulis* hemocytes constitute a morphologically and functionally non-homogenous cell population (Garcia-Garcia et al., 2008; Parisi et al., 2008; Donaghy and Volety, 2011). Small basophils (7  $\mu\text{m}$  of diameter in suspension) are in particular distinguished from large hyalinocytes and eosinophilic granulocytes (10  $\mu\text{m}$ , Le Foll et al., 2010). We have thus corrected single cell fluorescent determination of calcein content (FL1) for cell volume in order to obtain a genuine hemocyte calcein concentration (FL1-FC) allowing comparisons among cell types. In these conditions, basal FL1-FC in total hemocyte samples and in the absence of ABC blockers was uniformly distributed, independently of the mussel sampling sites. Thus, it is assumed that basal efflux activities are equivalent within the different hemocyte subtypes. However, mean basal calcein concentrations appeared lower in total hemocytes collected from mussels originating from the seaport of Le Havre, where mussel beds are more contaminated with various xenobiotics, including cadmium and hydrophobic organic compounds. This result may reflect an induction of efflux transporter mechanisms by toxicants of impacted areas, as already reported at mRNA or efflux activity levels for marine or freshwater mussels under environmental exposure or laboratory controlled experiments (Marin et al., 2004; Luedeking et al., 2005; Pain and Parant, 2007; Navarro et al., 2012).

To evidence the relative role of transporters, a pharmacological approach was used. None of the three type B ABC blockers tested (verapamil, zosuquidar and PSC833) did modify the fluorescence level relatively to non-treated cells, in hemocytes from the control site and in hemocytes from more contaminated mussel beds, as well. These data are consistent with previous studies indicating that ABCB/P-gp activity is absent, and not inducible, (Svensson et al., 2003) or very low in blue mussel (Luckenbach et al., 2004) as in freshwater painter's mussel (Zaja et al., 2006) blood

cells. These results are also in a good accordance with immunocytochemistry that failed to reveal a clear whole cell ABCB/P-gp membrane labeling. By contrast, MK571 elicited a 2-fold increase of calcein accumulation, confirming the exclusive role of ABCC/MRP transporters in hemocyte calcein efflux, as recently revealing in *M. galloprovincialis* hemocytes (Della Torre et al., 2013). Taken together, these data also indicate that ABC transporter activity profile in blue mussel hemocytes differs from *M. californianus* gills (Luckenbach and Epel, 2008), where both ABCB and ABCC transporters contribute to the MXR phenotype. Response to MK571 was somewhat dependent on the origin of the animals. In hemocytes withdrawn from mussels collected from Yport, MK571 provoked a homogenous increase of FL1-FC. In hemocytes originating from Le Havre, sensitivity to MK571 was high for a majority of cells, whereas 27% of cells, a proportion corresponding to basophilic cells (Le Foll et al., 2010), were less responsive. It is concluded that regulation of efflux activity is related to hemocyte subtypes.

Flow cytometry measurements allow gating strategies, in order to condition fluorescence analysis to *a priori* defined criteria. Our previous work (Le Foll et al., 2010) has defined cytomorphological outlines, according to cell size and complexity, usable to separate respective signals provided by living basophils, hyalinocytes and eosinophilic granulocytes. On the basis of these settings, we established MK571 dose–response relationships for each hemocyte subtype of both origin, Yport and Le Havre. We found that in mussels originating from Le Havre, large eosinophilic granulocytes of region 1, were characterized by greater basal fluorescence differences between low and high contaminated mussel beds, a more effective response to MK571 (4-fold increase in FL1-FC) and, therefore, an increased MXR activity factor.

#### 4.3. Methodological and physiological implications

This work provides a new approach for investigations of MXR phenotype in suspensions of invertebrate hemocytes. By contrast to homogeneous signals obtained from cell lines overexpressing ABC transporters (see for example, Pasquier et al., 2012), the variety cell volumes in hemolymph requires a careful standardization of single-cell fluorescence concentration achieved by the Coulter-type cell volume determination. Cell-size normalized measurements of MRP activity by flow cytometry in the absence/presence of MK571 and computation of the MXR activity factor in EV/SS dot plots restricted to regions corresponding to eosinophilic granulocytes can therefore be proposed as an optimized method to determine efflux activities in mussel collected from differentially contaminated areas or exposed to xenobiotics in laboratory experiments. Besides technological aspects, the present study shows that a low but effective efflux transport in *M. edulis* hemocytes relies mainly onto background ABCC/MRP activities shared by all hemocyte subtypes. This ABCC/MRP activity appeared to be inducible by environmental xenobiotics, principally in eosinophilic granulocytes which, in that case, exhibited a more increased MXR Activity Factor by comparison to hyalinocytes and basophils. The inducibility of MXR activity, specifically in eosinophilic granular cells, suggests that anti-MRP antibodies, such as QCLR1 (Lebedeva et al., 2011), might be used to explore the possibility of hemocyte subtypes phenotyping in mussels. This study also extends the list of tissues expressing ABCC/MRP pumps in adult marine mussels, adding the hemocytes to the gills, the mantle, the digestive gland and the posterior adductor muscle (Luedeking et al., 2005; Luckenbach and Epel, 2008).

However, the question of the physiological role of efflux pumps in hemocytes remains to be clarified. Type C ABC transporters are known to efflux GSH-, glucuronate- and sulfate-conjugated organic anions and, therefore, to be involved in resistance to toxicants (Leslie et al., 2005; Choudhuri and Klaassen, 2006). Efflux-based detoxification is a valuable biological activity in

selective permeability barriers and excretory organs known to express high levels of ABC transporters at specific localization of polarized cell membranes, such as the blood brain barrier and the liver in vertebrates (Deeley et al., 2006), the gills in mussels (Luckenbach and Epel, 2008). On the contrary, in formed elements of liquid tissues and in circulating immune cells, a diffuse efflux of xenobiotics seems to be fairly vain. Alternative biological functions for ABC transporters are then discussed (Johnstone et al., 2000; Mizutani et al., 2008). A dual role for multidrug transporters has been considered, mediating the efflux of xenobiotics and regulating cell migration (Elliott et al., 2004). In particular, it has been reported that both ABCB/P-gp and ABCC/MRP proteins are involved transport of generic paracrine factors (prostaglandins and leukotrienes) and specific chemokines as CCL19 and CCL21, all involved in migration of innate immune dendritic cells (van de Ven et al., 2008). As mussel hemocytes are highly motile cell, infiltrating tissue, and migrating to infected areas (Le Foll et al., 2010; Rioult et al., 2013), a role for ABC transporters in chemokinesis or chemotaxis can be speculated. Experiments are in progress to investigate this hypothesis. The present data support a physiological and/or defence role of MRP in eosinophilic granulocytes. More studies are needed for a better understanding of the mechanisms responsible for transporter activity regulation, and also, of the potential links of MRP functions with the immune response in mussels.

### Acknowledgments

This work was supported by grants from the State/Region Plan Contract (CPER) allocated through the Research Federation FED 4116 SCALE (Sciences Appliquées à L'Environnement). Damien Rioult was a recipient for a doctoral fellowship from the Conseil Régional de Haute-Normandie. We are indebted to Pr. Jean-Pierre Marie (Hôtel Dieu, Paris, France) for providing PSC833 and Zosuquidar.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.012>.

### References

- Akaishi, F.M., St-Jean, S.D., et al., 2007. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. *Aquat. Toxicol.* 82 (1), 1–14.
- Auffret, M., Rousseau, S., et al., 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63 (3), 393–405.
- Bard, S.M., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48 (4), 357–389.
- Beck, W.T., Grogan, T.M., et al., 1996. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations. *Cancer Res.* 56 (13), 3010–3020.
- Biedler, J.L., Riehm, H., 1970. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res.* 30 (4), 1174–1184.
- Blight, M.A., Holland, I.B., 1990. Structure and function of haemolysin B, P-glycoprotein and other members of a novel family of membrane translocators. *Mol. Microbiol.* 4 (6), 873–880.
- Bodin, N., Burgeot, T., et al., 2004. Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 138 (4), 411–427.
- Cajarville, M.P., Pal, S.G., 1995. Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment. *Cell Struct. Funct.* 20 (5), 355–367.
- Carballal, M.J., Lopez, C., et al., 1997. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Organ.* 29, 127–135.
- Chapuy, B., Koch, R., et al., 2008. Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration. *Leukemia* 22 (8), 1576–1586.
- Choudhuri, S., Klaassen, C.D., 2006. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int. J. Toxicol.* 25 (4), 231–259.
- Cornwall, R., Toomey, B., et al., 1995. Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates. *Aquat. Toxicol.* 31, 277–296.
- Costa, M.M., Prado-Alvarez, M., et al., 2009. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* 26 (3), 515–523.
- Deeley, R.G., Westlake, C., et al., 2006. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol. Rev.* 86 (3), 849–899.
- Della Torre, C., Bocci, E., et al., 2013. Differential ABCB and ABCC gene expression and efflux activities in gills and hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* and their involvement in cadmium response. *Mar. Environ. Res.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.06.005>.
- Donaghy, L., Volety, A.K., 2011. Functional and metabolic characterization of hemocytes of the green mussel, *Perna viridis*: in vitro impacts of temperature. *Fish Shellfish Immunol.* 31 (6), 808–814.
- Elliott, J.L., Raguz, S., et al., 2004. Multidrug transporter activity in lymphocytes. *Br. J. Pharmacol.* 143 (7), 899–907.
- Eufemia, N.A., Epel, D., 2000. Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR) P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses. *Aquat. Toxicol.* 49 (1–2), 89–100.
- Faria, M., Navarro, A., et al., 2011. Characterization of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in embryos and larvae of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and studies on its role in tolerance to single and mixture combinations of toxicants. *Aquat. Toxicol.* 101 (1), 78–87.
- Ferry, D.R., Russell, M.A., et al., 1992. P-glycoprotein possesses a 1,4-dihydropyridine-selective drug acceptor site which is allosterically coupled to a vinca-alkaloid-selective binding site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188 (1), 440–445.
- Fu, D., Bebawy, M., et al., 2004. Dynamic and intracellular trafficking of P-glycoprotein-EGFP fusion protein: implications in multidrug resistance in cancer. *Int. J. Cancer* 109 (2), 174–181.
- García-García, E., Prado-Alvarez, M., et al., 2008. Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families. *Dev. Comp. Immunol.* 32 (6), 637–653.
- Hagger, J.A., Jones, M.B., et al., 2008. Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: a case study. *Mar. Pollut. Bull.* 56 (6), 1111–1118.
- Hemroth, B., 2003. Factors influencing bactericidal activity of blue mussel (*Mytilus edulis*) haemocytes against *Salmonella typhimurium*. *Fish Shellfish Immunol.* 14 (2), 93–104.
- Holland, I.B., Blight, M.A., 1999. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J. Mol. Biol.* 293 (2), 381–399.
- Hollo, Z., Homolya, L., et al., 1994. Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1191 (2), 384–388.
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., et al., 2000. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem. Sci.* 25 (1), 1–6.
- Kartner, N., Shales, M., et al., 1983. Daunorubicin-resistant Chinese hamster ovary cells expressing multidrug resistance and a cell-surface P-glycoprotein. *Cancer Res.* 43 (9), 4413–4419.
- Kurelec, B., 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 23–43.
- Kurelec, B., Pivcevic, B., 1989. Distinct glutathione-dependent enzyme activities and a verapamil-sensitive binding of xenobiotics in a fresh-water mussel *Anodonta cygnea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164 (2), 934–940.
- Le Foll, F., Rioult, D., et al., 2010. Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. *Fish Shellfish Immunol.* 28 (2), 372–386.
- Lebedeva, I.V., Pande, P., et al., 2011. Sensitive and specific fluorescent probes for functional analysis of the three major types of mammalian ABC transporters. *PLoS ONE* 6 (7), e22429.
- Legrand, O., Simonin, G., et al., 1998. Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. *Blood* 91 (12), 4480–4488.
- Leslie, E.M., Deeley, R.G., et al., 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204 (3), 216–237.
- Luckenbach, T., Corsi, I., et al., 2004. Fatal attraction: synthetic musk fragrances compromise multixenobiotic defense systems in mussels. *Mar. Environ. Res.* 58 (2–5), 215–219.
- Luckenbach, T., Epel, D., 2005. Nitromusk and polycyclic musk compounds as long-term inhibitors of cellular xenobiotic defense systems mediated by multidrug transporters. *Environ. Health Perspect.* 113 (1), 17–24.
- Luckenbach, T., Epel, D., 2008. ABCB- and ABCC-type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294 (6), R1919–R1929.
- Luedeking, A., Koehler, A., 2002. Identification of six mRNA sequences of genes related to multixenobiotic resistance (MXR) and biotransformation in *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 238, 115–124.

Please cite this article in press as: Rioult, D., et al., The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of *Mytilus edulis* is mediated an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally inducible in eosinophilic granulocytes. *Aquat. Toxicol.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.012>

- Luedeking, A., Koehler, A., 2004. Regulation of expression of multixenobiotic resistance (MXR) genes by environmental factors in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 69 (1), 1–10.
- Luedeking, A., Van Noorden, C.J.F., et al., 2005. Identification and characterization of a multidrug resistance-related protein mRNA in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 286, 167.
- Marin, M., Legros, H., et al., 2004. Cell responses to xenobiotics: comparison of MCF7 multi-drug- and mussel blood cell multi-xenobiotic-defense mechanisms. *Mar. Environ. Res.* 58 (2–5), 209–213.
- Minier, C., Eufemia, N.A., et al., 1999. The multi-xenobiotic resistance phenotype as a tool to biomonitor the environment. *Biomarkers* 4 (6), 442–454.
- Minier, C., Moore, M.J., 1998. Calcein accumulation in mussel blood cells. *Mar. Environ. Res.* 1–5, 425–428.
- Minier, C., Moore, M.N., 1996. Induction of multixenobiotic resistance in mussel blood cells. *Mar. Environ. Res.* 42 (1–4), 389–392.
- Mizutani, T., Masuda, M., et al., 2008. Genuine functions of P-glycoprotein (ABCB1). *Curr. Drug Metab.* 9 (2), 167–174.
- Moore, M.N., Lowe, D.M., 1977. The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles. *J. Invertebr. Pathol.* 29 (1), 18–30.
- Morita, M., Imanaka, T., 2012. Peroxisomal ABC transporters: structure, function and role in disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1822 (9), 1387–1396.
- Navarro, A., Weissbach, S., et al., 2012. Abcb and Abcc transporter homologs are expressed and active in larvae and adults of zebra mussel and induced by chemical stress. *Aquat. Toxicol.* 122–123, 144–152.
- Olson, D.P., Taylor, B.J., et al., 2001. Detection of MRP functional activity: calcein AM but not BCECF AM as a Multidrug Resistance-related Protein (MRP1) substrate. *Cytometry* 46 (2), 105–113.
- Pain, S., Parant, M., 2007. Identification of multixenobiotic defence mechanism (MXR) background activities in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* as reference values for its use as biomarker in contaminated ecosystems. *Chemosphere* 67 (6), 1258–1263.
- Parant, M., Pain, S., 2001. Potential use of multixenobiotic defense mechanism (MXDM) in *Dreissena polymorpha* as a biomarker for the monitoring of freshwater pollution. *Water Res.* 35 (15), 3743–3748.
- Parisi, M.G., Li, H., et al., 2008. Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* 25 (6), 834–840.
- Pasquier, J., Galas, L., et al., 2012. Different modalities of intercellular membrane exchanges mediate cell-to-cell p-glycoprotein transfers in MCF-7 breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 287 (10), 7374–7387.
- Philipp, E.E., Kraemer, L., et al., 2012. Massively parallel RNA sequencing identifies a complex immune gene repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. *PLoS ONE* 7 (3), e33091.
- Pourtier-Manzanedo, A., Didier, A.D., et al., 1992. SDZ PSC 833 and SDZ 280-446 are the most active of various resistance-modifying agents in restoring rhodamine-123 retention within multidrug resistant P388 cells. *Anticancer Drugs* 3 (4), 419–425.
- Rioult, D., Le Foll, F., et al., 2013. Cell tracking and velocimetric parameters analysis as an approach to assess activity of mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes *in vitro*. *Cytotechnology*, 65 (5), 749–758. <http://dx.doi.org/10.1007/s10616-013-9558-2>.
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132, 365–386.
- Saez, G., De Jong, L., et al., 2008. Evaluation of pollutant exposure by chemical and biological markers in a Mediterranean French urban stream: a step for *in situ* calibration of multixenobiotic resistance transporter expression as biomarker in Chironomidae larvae. *Environ. Res.* 107 (3), 351–361.
- Shepard, R.L., Cao, J., et al., 2003. Modulation of P-glycoprotein but not MRP1- or BCRP-mediated drug resistance by LY335979. *Int. J. Cancer* 103 (1), 121–125.
- Shipp, L.E., Hamdoun, A., 2012. ATP-binding cassette (ABC) transporter expression and localization in sea urchin development. *Dev. Dyn.* 241 (6), 1111–1124.
- Smital, T., Sauerborn, R., et al., 2003. Inducibility of the P-glycoprotein transport activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquat. Toxicol.* 65 (4), 443–465.
- Stolarczyk, E.I., Reiling, C.J., et al., 2011. Regulation of ABC transporter function via phosphorylation by protein kinases. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12 (4), 621–635.
- Svensson, S., Sarngren, A., et al., 2003. Mussel blood cells, resistant to the cytotoxic effects of okadaic acid, do not express cell membrane P-glycoprotein activity (multixenobiotic resistance). *Aquat. Toxicol.* 65 (1), 27–37.
- Thomas, R.A., Krishan, A., et al., 2001. NASA/American Cancer Society high-resolution flow cytometry project-I. *Cytometry* 43 (1), 2–11.
- Urbatsch, I.L., Senior, A.E., 1995. Effects of lipids on ATPase activity of purified Chinese hamster P-glycoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* 316 (1), 135–140.
- van de Ven, R., Scheffer, G.L., et al., 2008. A role for multidrug resistance protein 4 (MRP4; ABCC4) in human dendritic cell migration. *Blood* 112 (6), 2353–2359.
- Venier, P., Varotto, L., et al., 2011. Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Genom.* 12, 69.
- Whalen, K.E., Sotka, E.E., et al., 2010. The role of multixenobiotic transporters in predatory marine molluscs as counter-defense mechanisms against dietary allelochemicals. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 152 (3), 288–300.
- Zaja, R., Klobucar, G.L., et al., 2006. Haemolymph as compartment for efficient and non-destructive determination of P-glycoprotein (Pgp) mediated MXR activity in bivalves. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 143 (1), 103–112.
- Zhou, Y., Gottesman, M.M., et al., 1999. The extracellular loop between TM5 and TM6 of P-glycoprotein is required for reactivity with monoclonal antibody UIC2. *Arch. Biochem. Biophys.* 367 (1), 74–80.

## ABC/MRP transporter activity and temperature regulate kinetic of mussel hemocytes migration

Riout, D., Peden, R., Dagher, Z., Bultelle, F., Lebel, J.M. & Le Foll, F.

(2013)

Afin de lutter contre les contaminations microbiennes, le système immunitaire des mollusques bivalves recrute les hémocytes circulants qui migrent vers les tissus infectés. Chez ces espèces marines poïkilothermes dont les vaisseaux sont dépourvus d'endothélium, le déplacement des cellules immunitaires est probablement sous l'influence de facteurs environnementaux ou physiologiques. Dans ce travail, nous avons recherché quelques uns des déterminants de la régulation de la migration des hémocytes prélevés sur la moule bleue *Mytilus edulis*. Immédiatement après leur dépôt sur des boîtes de culture en plastique contenant une solution physiologique saline marine (SPSM), les hémocytes s'étalent et commencent à se déplacer. Les grandes cellules les plus étalées, présentant un contour membranaire isotrope, s'avèrent moins motiles que les hémocytes condensés ou bipolaires. La migration hémocytaire prend la forme de déplacements aléatoires, conduisant parfois à des agrégations cellulaires et, en particulier, des interactions cellule-cellule dans lesquelles granulocyte et basophile se superposent. Nous avons obtenu une séquence peptidique partielle correspondant à 171 acides aminés d'une protéine homologue à cell division control 42 (CDC42), une GTPase monomérique de la famille Rho indispensable à la polarisation cellulaire. Ainsi, la migration des hémocytes de moules est plus proche d'une motilité type neutrophile que des déplacements de l'amibe sociale *Dictyostelium*. L'analyse des déplacements hémocytaires par suivi des noyaux après marquage au Hoechst 33342 et prise de vue à l'intervallomètre sous illumination UV contrôlée par un obturateur synchronisé, ne montre aucune phototoxicité pour des enregistrements prolongés jusqu'à 3 heures. Les vitesses populationnelles moyennes, mesurées à  $3,6 \pm 0,4$   $\mu\text{m}/\text{min}$  à 14°C immédiatement après ensemencement dans l'hémolymphe brute ou dans un milieu de culture formulé à partir de M199, sont significativement diminuées dans le SPSM. Le suivi de l'activité des hémocytes sur une très longue période par intervallométrie fractionnée révèle la survenue d'un pic de motilité accélérée après 24-48h de culture concomitamment à une augmentation transitoire de l'activité mitochondriale. L'analyse du cycle cellulaire indique qu'aucune mitose ne survient *in vitro*. Les vitesses moyennes et instantanées sont fortement dépendantes de la température. Le rôle des transporteurs à ATP-Binding Cassette (ABC) dans la régulation de la migration des hémocytes de moule a été recherché. Le MK571, un inhibiteur spécifique de la classe C des transporteurs ABC, exerce un effet chimiocinétique négatif, ce qui permet de suggérer une fonction pour ces pompes à efflux dans la migration cellulaire, comme cela a déjà été démontré dans des cellules dendritiques de vertébrés. Les hémocytes obtenus à partir de moules collectées sur un site plus exposé à la pollution chimique (port du Havre) sont moins motiles mais présentent une plus importante activité d'efflux liée aux transporteurs ABC, comparativement aux cellules provenant du site contrôle (Yport). Dans l'ensemble, nos résultats constituent de nouvelles données sur l'activité des hémocytes en culture. Chez les moules, la migration des cellules immunitaires est régulée par des facteurs intrinsèques et exogènes. La motilité hémocytaire pourrait constituer un marqueur d'intérêt pour l'évaluation de l'état et de la santé du système immunitaire.

*en préparation.*

# ABCC/MRP transporter activity and temperature regulate kinetic of mussel hemocytes migration

En préparation

Di	P	H	Te	R	I	C
Données initiales	Problèmes	Hypothèses	Tests	Résultats	Interprétations	Conclusions
<ul style="list-style-type: none"> <li>Les hématocytes sont des cellules motiles.</li> <li>La motilité est orchestrée par CDC 42 dans les neutrophiles des vertébrés mais pas chez <i>Dicystostellium</i>.</li> </ul>	Le déplacement des hématocytes de moule est-il de type amibe ou neutrophile ?	Recherche de CDC42 dans les hématocytes de <i>Mytilus edulis</i> .	RT-PCR, clonage et séquençage.	Les transcrits CDC42 sont présents dans les hématocytes de <i>Mytilus edulis</i> .		La motilité hématocytaire est plus proche de la migration leucocytaire que des déplacements de l'amibe sociale.
<ul style="list-style-type: none"> <li>Des facteurs abiotiques influencent la fonction immunitaire.</li> <li>Les poikilothermes sont confrontés à des changements de température.</li> </ul>	Les facteurs abiotiques ont-ils une action sur la migration des hématocytes ?	La vitesse de migration dépend de la température.  Un milieu de culture élaboré permet le maintien des vitesses dans le temps.  La pollution environnementale influence les vitesses de déplacement.	Vidéo-microscopie au x10.  Marquage des noyaux au Hoechst 33342.  Suivi des noyaux d'hématocytes en culture primaire.	Plus la vitesse augmente, plus les hématocytes se déplacent rapidement.  Les vitesses sont influencées par le milieu de culture à T0. Dans le temps une accélération est observée après 24h.  Sur un site contaminé les hématocytes migrent plus rapidement que ceux issus d'un site propre, mais uniquement à T0.	La vitesse de migration dépend de la température.  Un milieu de culture enrichi donne des vitesses comparables à celles mesurées dans l'hémolymphe pure.	<ul style="list-style-type: none"> <li>La mesure de motilité peut-elle être incluse dans les tests d'immunocompétence des invertébrés ?</li> <li>Existe-t-il des composés motilitoxiques ?</li> </ul>
Le réponse MTT augmente transitoirement à 24/48h	La réponse MTT reflète-t-elle un métabolisme augmenté ou une prolifération des hématocytes ?	Les hématocytes se divisent en culture.	Analyse du cycle cellulaire sur plusieurs jours en cytométrie en flux avec du Nirm-Dapi.	Cycle cellulaire présentant un très faible taux de division.	Les faibles taux de division mesurés ne peuvent pas expliquer cette élévation du test MTT.	D'où vient l'inflammation observée <i>in vitro</i> ?
Les transporteurs ABCC sont impliqués dans la migration des cellules dendritiques chez l'Homme.	Les transporteurs ABCC interviennent-ils dans la migration des hématocytes ?	La motilité fait intervenir les transporteurs ABCC chez <i>Mytilus edulis</i> .	Tracking nucléaire en présence de bloqueurs ABCC ou ABCC.	Seul le bloqueur ABCC (MK571) bloque la motilité.		Quel mécanisme lie les transporteurs ABC à la migration cellulaire ?
Données post-étude						
Nouveaux Problèmes						NP ...

## ABCC/MRP transporter activity and temperature regulate kinetic of mussel hemocytes migration

Damien Rioult<sup>†§</sup>, Romain Peden<sup>†</sup>, Zeina Dagher\*, Florence Bultelle<sup>†</sup>, Jean-Marc Lebel<sup>†</sup>  
and Frank Le Foll<sup>†</sup>

### Authors affiliations

<sup>§</sup>Corresponding author : Laboratory of Ecotoxicology UPRES EA 3222, IFRMP 23,

University of Le Havre, 76058 Le Havre cedex France, [frank.lefoll@univ-lehavre.fr](mailto:frank.lefoll@univ-lehavre.fr)

<sup>†</sup>Laboratory of Ecotoxicology UPRES EA 3222, IFRMP 23, University of Le Havre, 76058 Le Havre cedex, France

<sup>‡</sup>CNRS INEE - FRE3484 BioMEA Biologie des Mollusques marins et des Ecosystèmes Associés - IBFA - University of Caen, 14032 Caen CEDEX

\*Department of Biology, Lebanese University, Faculty of Sciences II, P.O. Box 90-656, Jdidet El Matn, Lebanon

### ABSTRACT

To fight microbial contamination, immune system of bivalve molluscs engages circulating hemocytes which migrate toward infected tissues. In these marine poikilotherms devoid of endothelial-closed vessels, cell motion may be influenced by environmental or physiologic factors. In the present work, we have investigated some determinants of motility regulation in hemocytes withdrawn from the blue mussel *Mytilus edulis*. Immediately after plating in plastic culture dishes bathed with a marine physiological salt solution (MPSS), hemocytes spread and started to move. Large spread cells with isotropic membrane edges were less motile than condensed or bipolar hemocytes. Hemocyte migration corresponded to random taxis that did not exclude aggregation and, in particular, one to one granulocyte-basophile overlapping. We obtained a partial sequence corresponding to 171 amino acids of a cell division control protein 42 homolog (CDC42), a small GTPase of the Rho family required for directional sensing. This indicates that migration of mussel hemocytes is closest to neutrophil-type taxis than to Dictyostelium-type amoeba movements. Long-term motion analysis by using nuclei tracking under shutter-controlled time-lapse UV exposure after Hoechst 33342 staining revealed no phototoxicity for continuous recordings as long as 3 hours. Mean populational velocity, measured at  $3,6 \pm 0,4 \mu\text{m}/\text{min}$  immediately after plating in crude hemolymph or in a M199-based culture medium at 14°C, was significantly lower in MPSS. Very long-term monitoring of hemocyte activity by fractionated time-lapse microscopy show the occurrence of a transient speed up of cell migration after 24-48 h of culture, associated to a concomitant bell-shaped rise of mitochondrial metabolic rate. Cell cycle analysis gave evidence for an absence of hemocyte mitosis in vitro. Instantaneous as well as mean velocities were strongly temperature-dependent. The role of ATP-Binding Cassette (ABC) transporters in the regulation of mussel hemocytes migration was investigated. MK571, a specific inhibitor of class C ABC transporters, exerted a negative chemokinetic effect, suggesting a function for these efflux pumps onto cell migration, as previously described in vertebrate dendritic cells. Hemocytes obtained from mussels sampled in a site more impacted by chemical pollutants (Le Havre harbor) were less motile but displayed higher class C ABC-mediated efflux activity than cells collected from the control site (Yport). Taken together, our findings supply new data on hemocyte activity in culture. In mussels, immune cell motility is regulated by intrinsic and exogenous factors and should be regarded as a potential marker useful for the assessment of immune system health or status.

**Keywords :** mussel blood cells, innate immunity, time lapse imaging, motility

## 1. INTRODUCTION

## 2. MATERIAL AND METHODS

### *Mussel collection and hemolymph withdrawal*

Unless otherwise indicated, adult mussels (4-5 cm shell length), *M. edulis*, were collected between December and February in 2011, 2012 and 2013 on the intertidal rocky shore of Yport, France (49°44'N, 0°18'E). Alternatively, mussels were originating from the sea harbor of Le Havre, in a subtidal bed of basin Vétillard (49°74'N, 0°31'E). Mussels were transported to the laboratory for immediate analysis. Hemolymph was aseptically withdrawn, in a BSL2 laminar flow cabinet, from the posterior adductor muscle sinus, by gentle aspiration with a 1 mL syringe equipped with a 22G needle.

### *Hemocyte culture*

Volumes of crude hemolymph corresponding to 100 µL or 200 µL were deposited in 35-mm culture dishes (Corning, New York, NY). After 30 minutes of sedimentation, hemolymph was removed and each well or dish were washed twice by using marine physiological saline solution (MPSS) containing (in mM): 470 NaCl, 10 KCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 10 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (Hepes), 48.7 MgSO<sub>4</sub>, pH 7.8, 0.2 µM sterile filtered. In some experiments, cells were covered with a marine M199 (MM199) medium adapted to seawater osmolality. MM199 was formulated as following : M199 salts (M0393, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 10.6 g.L<sup>-1</sup>, completed with (in mM) : 250 NaCl; 10 KCl ; 2.5 CaCl<sub>2</sub>; 11 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (Hepes); 25 MgSO<sub>4</sub>, pH 7.8, 0.2 µM sterile filtered and supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 µg mL<sup>-1</sup> streptomycin, 60 µg mL<sup>-1</sup> penicillin G. Osmolality of MPSS and MM199 were checked to be close to local seawater osmolality (963 mOsmol kg.l<sup>-1</sup>) by using a vapour pressure osmometer (WescorElitech, Logan, UT). The cells were then maintained at 14 °C in a IPP55 temperature-controlled incubator (Memmert, Swabach, Germany).

### *Live-cell confocal microscopy*

Hemolymph was deposited in 35-mm glass bottom culture 35-mm culture dishes (Mattek, Ashland, MA) for subsequent live-cell microscopy. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (10 µM, excitation 405 nm, emission 420 nm) in MPSS for 30 min. In some experiments, cells were labeled with 1 mg/ml Alexa Fluor 488-conjugated wheat germ agglutinin (WGA,

Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France ; excitation 473 nm, emission 520 nm) at 5 µg/ml for 10 min at room temperature in the dark. WGA is a probe for detecting glycoconjugates that selectively binds to N-acetylglucosamine and N-acetylneuraminic acid residues of cell membranes. After staining, cells were washed 3 times in MPSS. Imaging was performed using a Olympus FV10i-LIV automated confocal microscope (Olympus France S.A.S., Rungis, France) with a 60x phase contrast water immersion objective (numerical aperture 1.2). Post-acquisition image analysis was performed with FV10-ASW 3.1 (Olympus) or ImageJ 1.47 (NHL USA).

### *RNA extraction*

Total RNA from hemocytes was extracted using a Qiagen RNeasy Mini Kit according to the manufacturer's protocol (Catalog no. 74104, Qiagen, France). RNA concentrations and purity were measured using a NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, ThermoScientific, France), and sample integrity was evaluated after RNA migration in a 1.2% agarose gel electrophoresis, before storage at -80°C. Samples exhibited no RNA fragmentation and had 260:280 nm ratios upper than 1.8. Messenger RNA (mRNA) contained in 1 µg of total RNA were reverse transcribed to complementary first-strand DNA (cDNA) with SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Catalog no. 18080-051, Invitrogen, France) using oligo(dT)20 in presence of RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (Catalog no. 10777-019, Invitrogen, France) according to the manufacturer's protocol. Finally, cDNAs (40 µL) were diluted in ultra-pure water and stored in aliquots at -20°C.

### *Cell Division cycle protein 42 transcript molecular cloning and sequencing*

Degenerate primers (DP) were designed from *cde42* DNA sequences available on the EMBL-EBI database (<http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>; Table 1). PCR amplifications were performed with each DP (synthesized by Eurogentec, France) under the following conditions: pre-denaturation at 94°C for 2 min, 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 45°C for 30 sec, extension at 72°C for 30 sec and, following the final cycle, an additional extension at 72°C for 5 min. The amplified PCR products were isolated from 1.2% agarose gel, cloned into pGEM®-T Vector System (Catalog no. A3610, Promega, France) and transformed into competent *Escherichia coli* cells XL1-Blue (Stratagene, Amsterdam, Netherlands). Positive recombinants were selected on a Luria-Bertain (LB) plate with X-gal and IPTG. The white bacterial colonies were amplified and plasmids were extracted and

purified according to the QIAquick PCR Purification kit (Catalog No. 28104, Qiagen, France) instructions. Sequencing was conducted by the Genosphere Biotechnologies Company (France).

Alignment of translated DNA with proteins was performed using BlastX and multiple alignment of protein sequences was performed by CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/services>).

Oligo name	Sequence (5'-3')
<i>cdc42(a).F</i>	ATHWSNTAYACBACBAAYAAARTT
<i>cdc42(a).R</i>	ARNGCNSWRCAAYTCNACRTA
<i>cdc42(b).F</i>	ATGCARACBATHAARTGYGT
<i>cdc42(b).R</i>	NGCYTCRTCRAANACRTTYTT

Table 1. Primers used for degenerate PCRs  
Forward and reverse primers are indicated by F and R, respectively, at the end.

#### *Wild-field time-lapse microscopy, cell tracking and trajectories analysis*

To quantify velocity, cells in culture were incubated with 10  $\mu$ M of the nuclei-specific fluorescent probe Hoechst 33342 for 30 minutes at 14°C. A culture dish was placed on the stage of a TE-2000 inverted microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France) equipped for epifluorescence excitation (HBO arc lamp with 377/50 nm bandpass filter) and time-lapse imaging. A Peltier temperature controller (PDMI-2 and TC-202A; Harvard Apparatus, Holliston, MA) keeps preparation at 14°C for extended live cell imaging. Wild-field epifluorescence time-lapse imaging was performed with a x10 objective (numerical aperture 0.3). A VCM-D1 shutter (Umbilitz, Vincent Associates, NY) was added in the illumination pathway to cut off the excitation light between two image recordings. Camera and shutter were controlled by Metamorph (Molecular Device, Sunnyvale, CA) as acquisition software. A CCD Coolsnap EZ camera (Photometrics, Tucson, AZ) captured 12-bit digital of 1392  $\times$  1040 pixels grayscale images every 30 s for 30 min (409 nm long path emission filter). Camera and software were calibrated to express distance in microns. Time-series image stacks were imported into Metamorph Analysis software. The track Objects application (available with Multi-Dimensional Motion Analysis option) was started. Typically, for each biological replicate, 20 nuclei were randomly chosen to be tracked. Extracted data were transferred to a

spreadsheet and, for each cell, the mean distance travelled during 30 seconds was calculated and multiplied by 2 to express velocity in  $\mu$ m.min<sup>-1</sup>.

#### *MTT bioassay*

A MTT assay was used to determine cell number in each well. In the presence of viable cells, MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, is enzymatically reduced to the purple dye formazan. The assay was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, hemoocytes were softly placed in 96-well cell culture plates and allowed to adhere for 30 min at 14°C. Thereafter, cells were rinsed with MPSS and incubated in MPSS containing 0.2 mg/mL MTT. After 4 hours at 14°C, the MTT solution was removed and 200  $\mu$ L of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to each well to solubilize formazan crystals. The absorbance was then measured at a wavelength of 570 nm with a 630 nm reference using a micro plate reader (Elx808; Biotek, Winooski, VT).

#### *Analysis of cell cycle by flow cytometry*

Cell culture medium was replaced by 75% Nuclear Isolation and Staining Medium (NIM-DAPI, NPE system, USA) solution prepared into MPSS. After 1 min., the solution containing isolated nuclei was collected and directly analysed. The fluorescent light (FL) was quantified using a Cell Lab Quanta SC MPL flow cytometer (Beckman Coulter) equipped with a HBO excitation lamp (355/37 nm). Voltage settings of photomultipliers were not modified throughout the experiments (Pasquier et al. 2012). Marine Isodiluent of seawater osmolality was used as sheath fluid. Usually, the cytometer was operated at a flow rate of 30 mL/min. Particle sizes were accurately determined by using the Coulter-type electronic volume (EV) channel of the cytometer, after calibration with 10- $\mu$ m FlowCheck microspheres (Le Foll et al. 2010). Each analysis consisted in a record of 20 000 events, triggered on fluorescence (FL) as primary parameter. Blue FL was quantified via the FL1 channel (linear scale) through 465-nm band pass filter.

#### *Statistical analysis*

All quantitative data were expressed as mean  $\pm$  standard error. Statistical analysis was performed by using SigmaPlot 12 (Systat Software Inc., Chicago, IL). A Shapiro-Wilk normality test, with a  $p=0.05$  rejection value, was used to test normal distribution of data prior further analysis. All pairwise multiple comparisons were performed by one way ANOVA followed by Holm-Sidak posthoc tests for data with normal distribution or by Kruskal-Wallis

analysis of variance on ranks followed by Tukey posthoc tests, in case of failed normality test. Paired comparisons were performed by Student's t-tests or by Mann-Whitney rank sum tests in case of unequal variance. Statistical significance was accepted for  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  or  $***p < 0.001$ .

### 3. RESULTS

#### 3.1 Free field mussel hemocytes motility

Velocity of hemocyte migration was followed by dynamic microscopy *in vitro*. After plating, cells were allowed to adhere 20 minutes and then imaged in a Marine Physiological Salt Solution (MPSS), by using time-lapse recordings under controlled temperature. As described earlier (Le Foll et al. 2010), the cell population was extremely motile. Individual hemocytes exhibited fast outstanding morphology changes. This feature renders difficult image-to-image single cell tracking because cells escaped to automatic shape recognition. This difficulty was overcome by using nuclei tracking with the DNA fluorescent probe Hoechst 33342 (Rioutl et al. 2013). As seen the representative sequence obtained by confocal microscopy Figure 1A and in corresponding supplementary video\_1, while hemocyte outlines considerably varied during the recording, nuclei shapes remained remarkably constant and were easy to follow over time. After 30 min of wide field epifluorescence recording at a rate of 1 image/30 sec, off-line tracking was carried out on a set of 20 nuclei, selected randomly in the microscopic field (supplementary video\_2). Figure 1B shows the resulting determined trajectories. Mussel hemocytes migrated by random taxis (Figure 1C). Cells escaping the recorded field were excluded from the analysis. Mussel hemocytes are also known to form aggregates. Two types can be distinguished. Massive aggregates (Rioutl et al. 2013; Le Foll et al. 2010) are principally found the first day of culture and mostly result from vigorous pipetting (Figure 2A). Such glomerular structures are characterized by complex cell-to-cell interactions (supplementary video\_3 & 4). Smaller aggregates exhibited clear di- (or small-number) cellular intense-contacts. As mentioned before without known significance (Rioutl et al. 2013; Le Foll et al. 2010), these cell-to-cell interactions very often involve a star-shaped basophil hemocyte settling onto a spread eosinophilic granulocyte (Figure 2B, supplementary video\_5). Because cell-to-cell interactions alter single cell motility, small and large nuclei aggregates were also excluded from the study.

Motile eukaryotic cells, as neutrophils or the amoeba *Dictyostelium discoideum*, initiate taxis through the orchestration of a signaling cascade at the migration front, that give rise to cellular polarization. It is well established that Rho-family GTPases are essential regulators of cell polarity and motility (Parent 2004). Among the monomeric G-proteins controlling direction sensing through actin polymerization at the leading edge of neutrophils, the cell division cycle 42 protein (CDC42) plays a central role. Intriguingly, despite intense database searches Rho or CDC42 homologues are still missing in *Dictyostelium discoideum*. Herein, from *Mytilus edulis* hemocytes total RNA extract, we have clone a partial sequence encompassing 171 amino acids of a CDC42 protein (accession n° FM174470, Figure 3). The complete length of the protein is 191 amino acids in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (accession n° JH818665). This indicates that migration of mussel hemocytes is closest to neutrophil-type taxis than to *Dictyostelium*-type amoeba movements.

#### 3.2 Effects of culture parameters on mussel hemocyte velocity

In order to determine the influence of the bathing medium in hemocyte migration, mean cell velocity was established by phase contrast wide field nuclei tracking (1image/30 s) at 14 °C under controlled temperature in various extracellular solutions (Figure 4A), immediately after tracking. No significant difference was measured between crude hemolymph and a modified M199-based culture medium. However, hemocyte velocity was lower in MPSS. Experiments carried out over long period of continuous recording under repeated 377/50-nm UV excitation, in MPSS and in MM199 as well, show variations of hemocyte motility with time. During the first phase, hemocyte velocity was stabilized to a plateau and then, after three hours of recordings, progressively falls (Figure 4B). 48-hours fractionated recordings, where a single cell culture was distributed into six distinct 35-mm dishes and sequentially recorded, produced periodic velocity time courses. Highest migration speeds were obtained at the beginning of the recording session and gradually decreased with time (Figure 4C). These results were understood as a deleterious effect of recording conditions onto viability of hemocytes in primary culture. To decipher the origin of toxicity, hemocytes were separately treated for 8 hours with repeated UV flashes (a one-sec flash every 30 sec), with 10  $\mu$ M Hoechst 33342 or with a combination of two. A marked effect of dual exposure was obtained (Figure 4D), revealing a synergistic action of UV phototoxicity and Hoechst DNA binding on mean cell velocity.

Hemocyte velocity determinations were combined to mitochondria metabolic rate measurements, assessed by MTT bioassays, in order to monitor global cell population activity over 4 days of culture in MPSS or in MM199 at 14 °C. After 24 h of culture, migration velocity increased transiently from a day 0 value of  $2.78 \pm 0.3 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$  in MPSS ( $3.01 \pm 0.4 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$  in MM199) to reach a mean value significantly higher,  $4.57 \pm 0.52 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$  ( $4.50 \pm 0.11 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$  in MM199), after 24h of primary culture (Figure 5A). This effect was accompanied by a concomitant bell-shaped raise of metabolic activity, peaking at day 2 (Figure 5C). Both motile and mitochondrial activities declined afterwards to be equal or less than initial values at days 3 and 4. Hemocyte migration speed continued to decrease gradually until day 12, where cells were essentially not motile (Figure 5B). The peak of MTT OD observed at 48 hours of culture did not correspond to a growth of cell number, since cell cycle analyses gave evidence for an absence of mitosis (Figure 5D). Hypoploidic events reported at days 3 and 4 are evocative of hemocyte death increase.

Temperature elevation resulted in a speed up of mussel hemocyte velocity (supplementary video\_6). This response was evidenced at the single cell level. Stepwise incubation medium temperature augmentations caused an increase of instantaneous nucleus speed with oscillations of larger amplitudes and non-changed frequency (Figure 6A). Histograms giving individual cell velocity distribution revealed an increased dispersion of speed extrema at higher temperatures, from 0,1 to  $4 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$  at 14°C, from 0,2 to  $6 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$  at 18°C and from 0,4 to  $7,8 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$  at 22°C (n=100, figure 6B). These effects of acceleration and dispersion were also found when migration speed was expressed as a mean populational velocity, computed from the average migration of twenty individual cells randomly sample in multiplicate experiments (Figures 6C and D).

### 3.3 Multixenobiotic resistance transporter activity and environmental contamination modulate cell migration

In a previous work (Riout et al.), we have demonstrated that *Mytilus edulis* hemocytes are able to efflux xenotoxicants by means of ATP-Binding Cassette (ABC) transporter activities that confer a multixenobiotic resistance (MXR) phenotype. Cell-volume normalized fluorescence concentration measurements obtained by combining flow cytometry to accurate Coulter cell sizing revealed that, in these cells, the MXR phenotype is mediated by an ABC/MRP-type transporter activity principally supported by eosinophilic granulocytes. As

MRP transporters have been reported to be involved in the regulation of immune cell migration in vertebrates (van de Ven et al. 2008), we have investigated a potential role for these proteins in motility control in mussel hemocytes. As shown in Figure 7, MK571, a specific inhibitor of ABC/MRP transporters, provoked a marked drop of hemocyte migration at day 0 and at day 2 of culture, in cells collected from mussels sampled at different locations, namely Yport (a control site) and Le Havre (a site more impacted by chemical contamination). Other ABC transporters inhibitors, specific from ABCBP-glycoprotein, were devoid of effect.

Given the variations of MRP efflux activities measured in hemocytes from mussel beds differentially impacted by marine pollution (Riout et al.), mean migration velocities in primary cultures were compared overtime (Figure 8). As already described above, a peak of motility was observed after 24 to 48h of culture, similarly for hemocytes originating from Yport and from Le Havre. Velocity time courses then declined in parallel, without significant difference among collection sites. The initial velocity at plating at day 0, however, was significantly lower for hemocytes collected from mussels sampled in the harbour of Le Havre than for cells withdrawn from mussel of the rocky shore of Yport. This particular observation suggests that hemocyte motility at day 0 could be used to monitor the immune status or health of animals from distinct origins. Nevertheless, absence or presence of various intrinsic or extrinsic factors probably strongly alter hemocyte activity after several hours in culture and potentially mask a physiological fine tuning due to environmental modulation.

#### 4. DISCUSSION

This work was supported by grants from the State/Region Plan Contract (CPER) allocated through the Research Federation FED 4116 SCALE (Sciences Appliquées à L'Environnement). Damien Rioult was a recipient for a doctoral fellowship from the Conseil Régional de Haute-Normandie. Romain Peden was a recipient for a doctoral fellowship from the COmmunauté De l'AggloMération Havraise (CODAH).

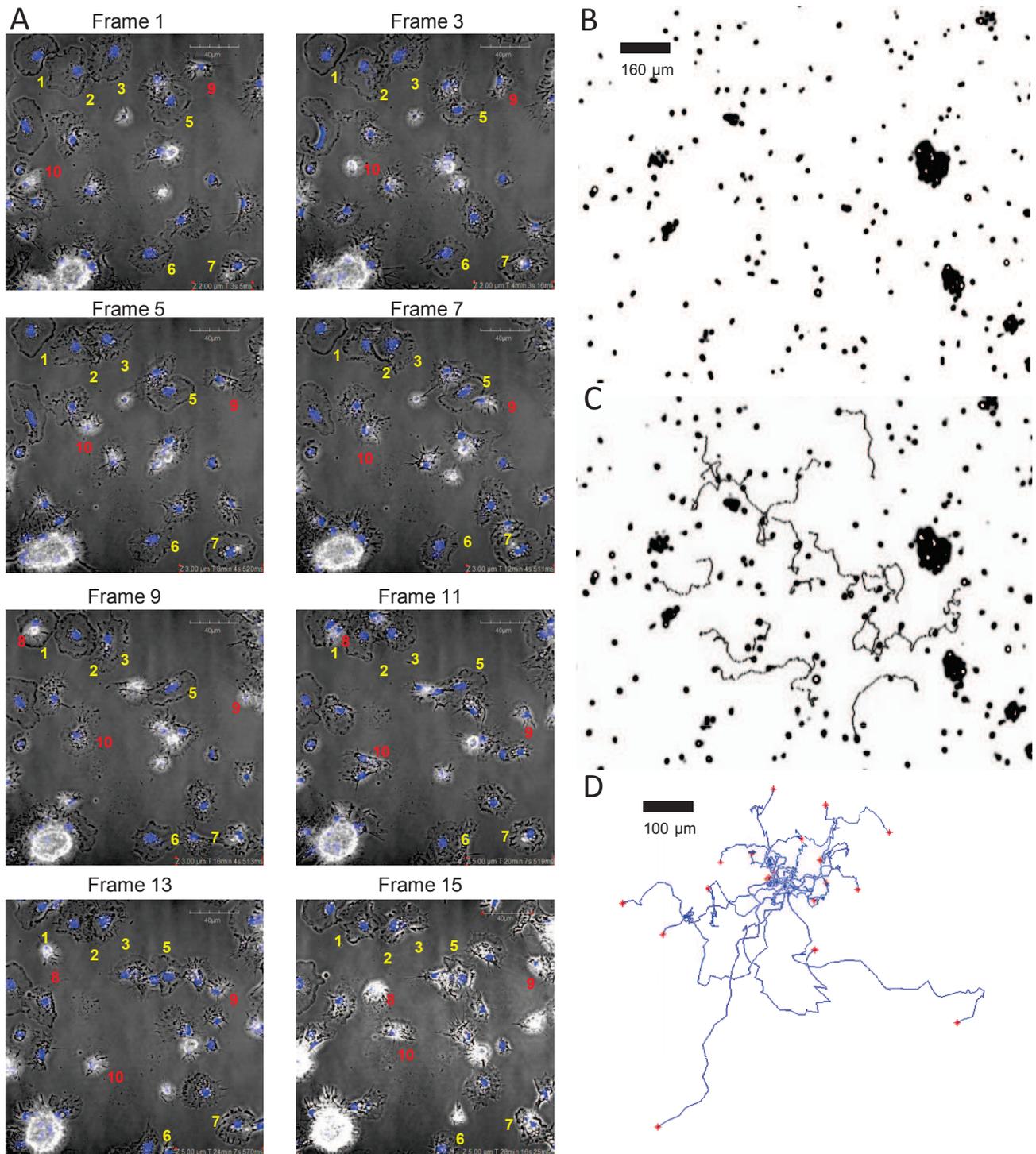
#### 6. SUPPLEMENTARY MATERIAL

- Video1
- Video2
- Video3
- Video4
- Video5
- Video6

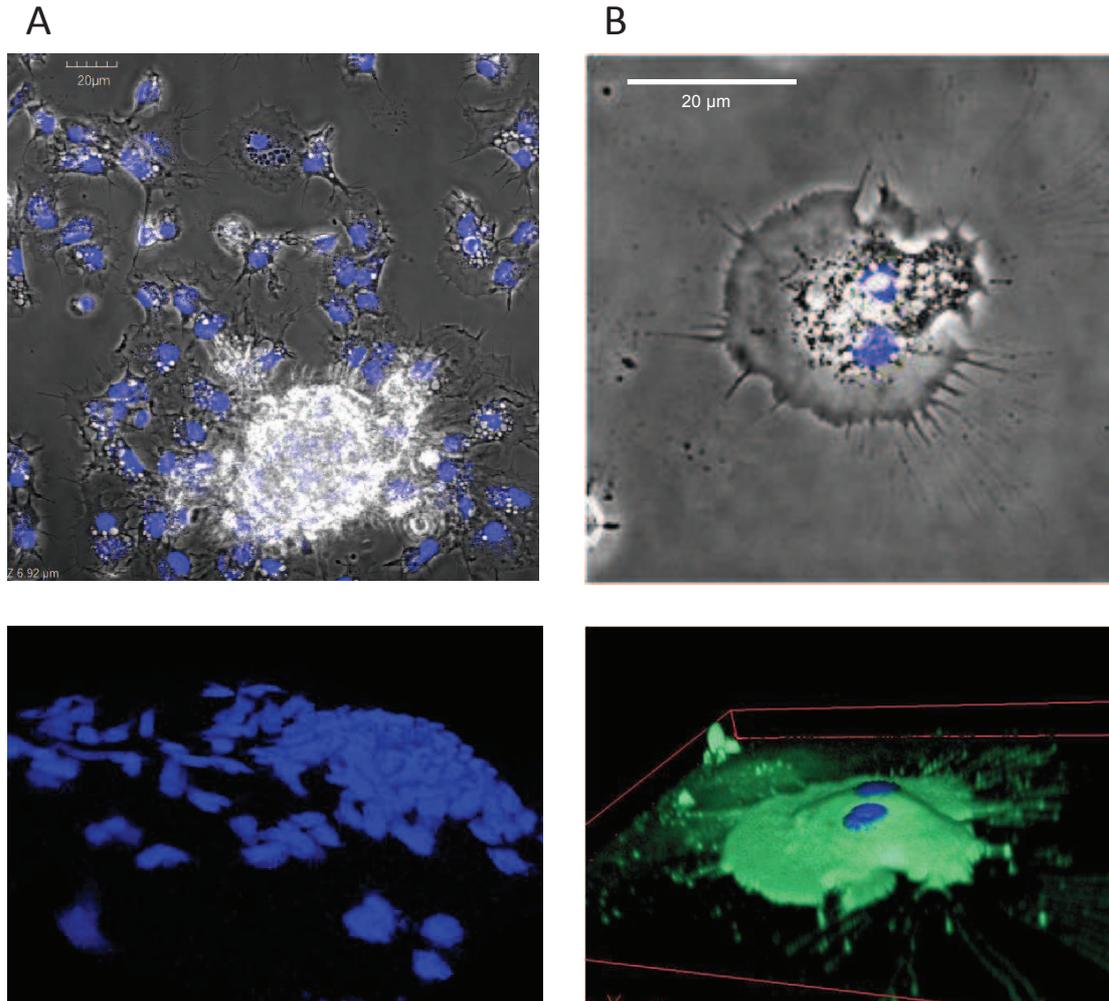
#### REFERENCES

- Balseiro P, Falco A, Romero A, Dios S, Martinez-Lopez A, Figueras A, Estepa A, Novoa B (2011) Mytilus galloprovincialis myticin C: a chemotactic molecule with antiviral activity and immunoregulatory properties. *PLoS One* 6 (8):e23140. doi:10.1371/journal.pone.0023140
- Ciacci C, Canonic B, Bilanicova D, Fabbri R, Cortese K, Gallo G, Marcomini A, Pojana G, Canesi L (2012) Immunomodulation by different types of N-oxides in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS One* 7 (5):e36937. doi:10.1371/journal.pone.0036937
- Costa MM, Prado-Alvarez M, Gestal C, Li H, Roeh P, Novoa B, Figueras A (2009) Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish Shellfish Immunol* 26 (3):515-523
- Donaghy L, Volety AK (2011) Functional and metabolic characterization of hemocytes of the green mussel, *Perna viridis*: in vitro impacts of temperature. *Fish Shellfish Immunol* 31 (6):808-814. doi:10.1016/j.fsi.2011.07.018
- Gerdol M, Manfrin C, De Moro G, Figueras A, Novoa B, Venier P, Pallavicini A (2011) The C1q domain containing proteins of the Mediterranean mussel *Mytilus*

- galloprovincialis: a widespread and diverse family of immune-related molecules. *Dev Comp Immunol* 35 (6):635-643. doi:10.1016/j.dci.2011.01.018
- Le Foll F, Rioult D, Boussa S, Pasquier J, Dagher Z, Le Boulenger F (2010) Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. *Fish Shellfish Immunol* 28 (2):372-386. doi:10.1016/j.fsi.2009.11.011
- Parent CA (2004) Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and Dictyostelium. *Curr Opin Cell Biol* 16 (1):4-13. doi:10.1016/jceb.2003.11.008
- Parisi MG, Li H, Jouvét LB, Dyrzynda EA, Parrinello N, Cammarata M, Roeh P (2008) Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria. *Fish Shellfish Immunol* 25 (6):834-840. doi:10.1016/j.fsi.2008.09.005
- Pasquier J, Galas L, Boulange-Lecomte C, Rioult D, Bultelle F, Magal P, Webb G, Le Foll F (2012) Different modalities of intercellular membrane exchanges mediate cell-to-cell p-glycoprotein transfers in MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* 287 (10):7374-7387. doi:10.1074/jbc.M111.312157
- Philipp EE, Kraemer L, Melzner F, Poustka AJ, Thieme S, Findeisen U, Schreiber S, Rosenstiel P (2012) Massively parallel RNA sequencing identifies a complex immune gene repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. *PLoS One* 7 (3):e33091. doi:10.1371/journal.pone.0033091
- Rioult D, Le Foll F, Lebel J-M (2013) Cell tracking and velocimetric parameters analysis as an approach to assess activity of mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes *in vitro*. *Cytotechnology*. doi:10.1007/s10616-013-9558-2
- Rioult D, Pasquier J, Boulange-Lecomte C, Marin M, Durand F, Mignier C, Le Foll F (2012) MRP(ABCC)-mediated Multi Xenobiotic Resistance phenotype of eosinophilic granulocytes as a potential optimized biomarker of environmental exposure to xenobiotics in *Mytilus edulis*. *In revision*
- Rosani U, Varotto L, Rossi A, Roeh P, Novoa B, Figueras A, Pallavicini A, Venier P (2011) Massively parallel amplicon sequencing reveals isotype-specific variability of antimicrobial peptide transcripts in *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS One* 6 (11):e26680. doi:10.1371/journal.pone.0026680
- Tanguy M, McKenna P, Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Danger JM, Siah A (2013) Functional and molecular responses in *Mytilus edulis* hemocytes exposed to bacteria, *Vibrio splendidus*. *Dev Comp Immunol* 39 (4):419-429. doi:10.1016/j.dci.2012.10.015
- van de Ven R, Scheffer GL, Reurs AW, Lindenberg JJ, Oerlemans R, Jansen G, Gillet J-P, Glasgow JN, Pereboev A, Curjel DT, Schep RJ, de Groot TD (2008) A role for multidrug resistance protein 4 (MRP4; ABCC4) in human dendritic cell migration. *Blood* 112 (6):2353-2359. doi:10.1182/blood-2008-03-147850
- Venier P, Varotto L, Rosani U, Millino C, Celegato B, Bernante F, Lanfranchi G, Novoa B, Roeh P, Figueras A, Pallavicini A (2011) Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Genomics* 12:69
- Vera M, Martinez P, Poisa-Beiro L, Figueras A, Novoa B (2011) Genomic organization, molecular diversification, and evolution of antimicrobial peptide myticin-C genes in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *PLoS One* 6 (8):e24041. doi:10.1371/journal.pone.0024041



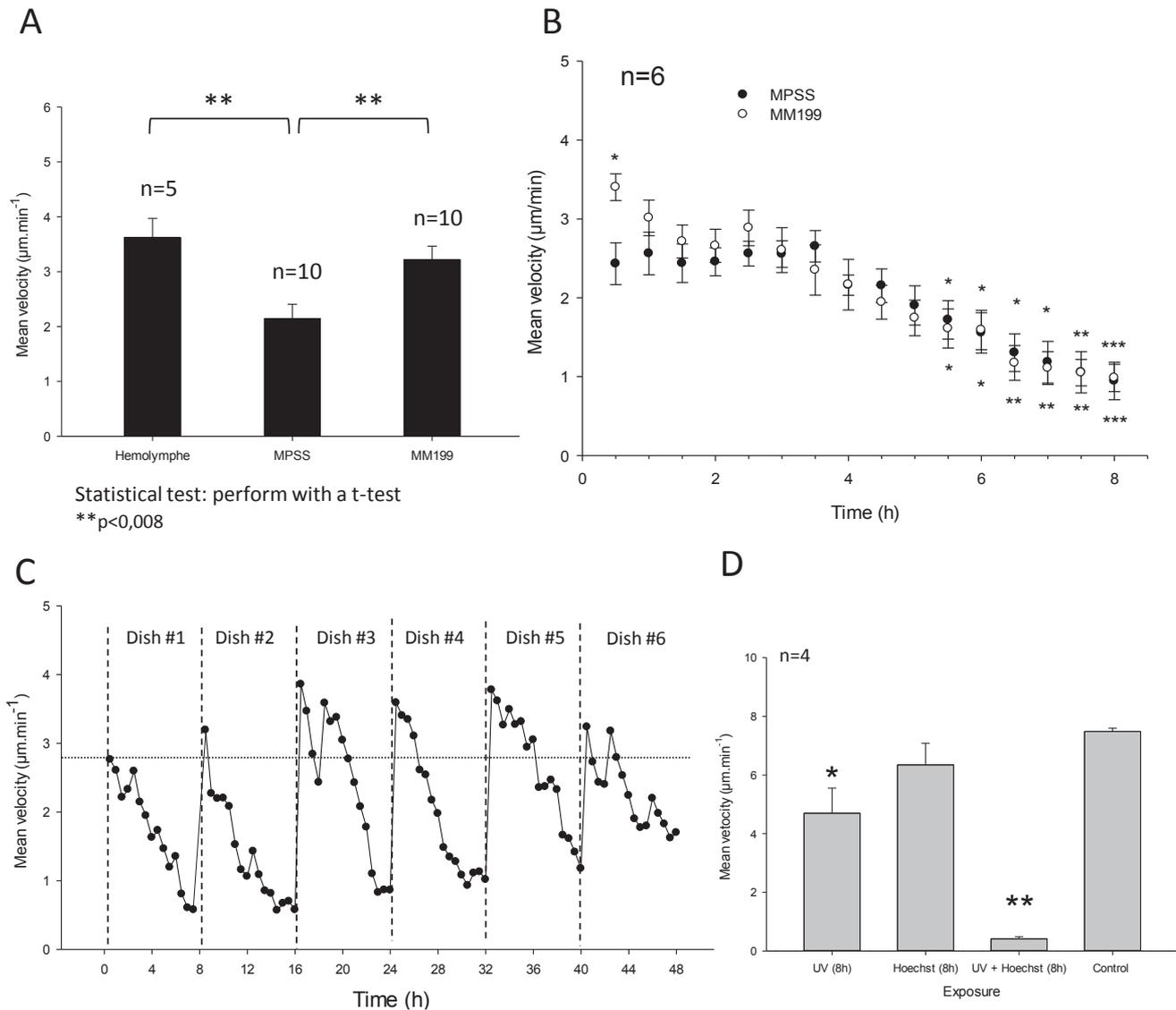
**Figure 1. *Mytilus edulis* hemocyte tracking by time lapse imaging of Hoechst 33342-stained nuclei.** **A**, 500  $\mu$ L of freshly withdrawn hemolymph were plated on glass bottom 35-mm dishes and covered with 2 mL MPSS. Nuclei were stained with Hoechst 33342. Cell and nuclei motion were imaged by Z-stack (1  $\mu$ m per optical slice ; 8 slices per stack) time-lapse confocal microscopy at a rate of 1 Z-stack every 2 minutes. Odd merged freeze frames (4-min intervals) obtained from Hoechst (laser illumination, excitation 405 nm, emission 455 nm) and phase contrast channels corresponding to supplementary video\_1 are presented. Some weakly motile spread cells are numbered in yellow (1 to 7), while fast moving and shape changing cells are numbered in red (9 to 10). **B**, last wide field epifluorescence inverted micrograph from a 30-min 0.033-Hz time-lapse sequence under x10 magnification used to track nuclei stained with Hoechst 33342 (HBO arc lamp, excitation 377/50 nm, emission 409 nm). **C**, twenty hemocytes tracks computed from nuclei in motion for 30 minutes in the microscopic field and distinct from aggregates are superimposed to the image shown in B. See supplementary video\_2 to follow the offline tracking process. **D**, overlay of twenty hemocyte trajectories displayed from a common origin. The point reached by each cell after 30 min recording is indicated by a red cross.



**Figure 2. Cell to cell interactions in large and small size aggregates.**

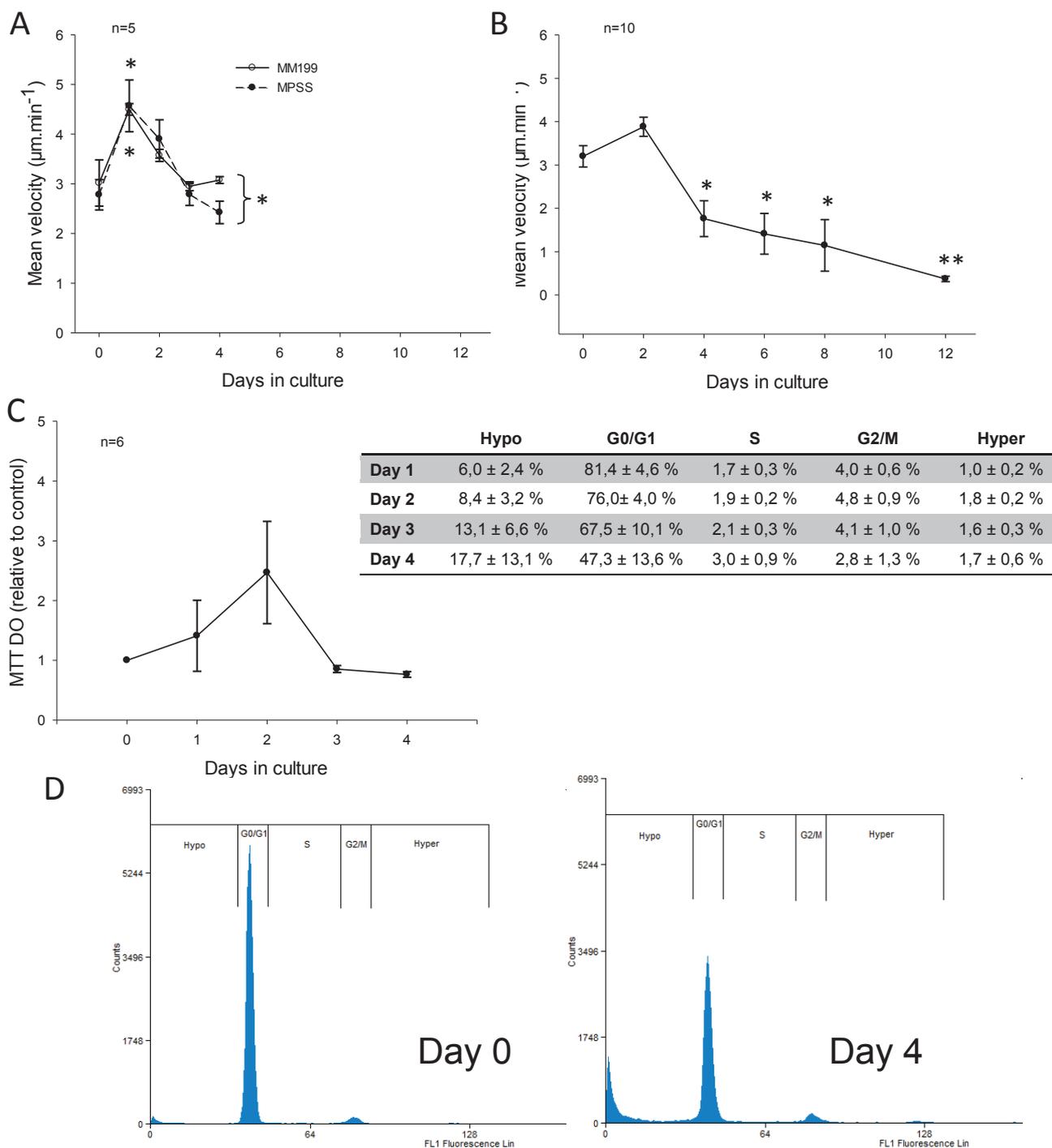
**A**, a large hemocyte aggregate was imaged by live-cell confocal microscopy. Nuclei were stained by Hoechst 33342 and the preparation was scanned over 26 μm in depth *via* optical slicing at 64 focus positions incremented by 0,406 μm (supplementary video\_3). Top image shows merged Hoechst and phase contrast channels in slice 17. Bottom image corresponds to a three-dimensional reconstruction of the hemocyte aggregate, captured from video\_4. **B**, hemocyte membrane glyconjugates were labelled with Alexa Fluor 488-conjugated wheat germ agglutinin and nuclei with Hoechst 33342 in MPSS for imaging. A small hemocyte-hemocyte structure, understood as a basophilic cell settling onto a spread granulocyte, was selected. Top image corresponds to merged Hoechst and phase contrast channels. Bottom view is a three-dimensional reconstruction including Hoechst and WGA channels from video\_5. Note the relative position of cells and the proximity of nuclei.





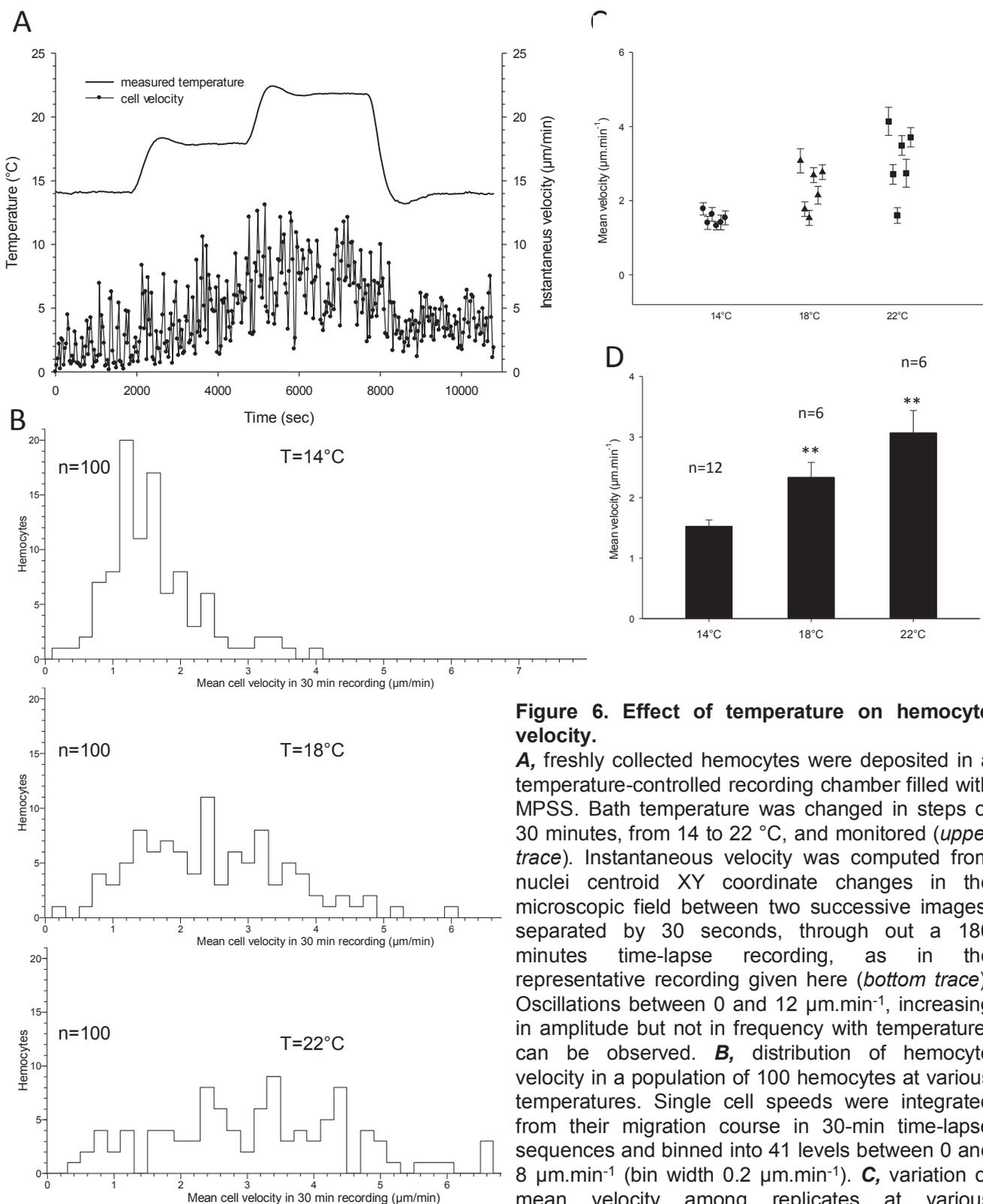
**Figure 4. Effects of bathing medium and tracking duration on hemocyte velocity.**

Mean hemocyte velocity was determined *in vitro* from migration distance of Hoechst 33342 stained nuclei in wide field epifluorescence time-lapse recordings, under x10 magnification and at 14°C, as presented in Figure 1B-C. Biological replicates, corresponding to distinct mussels used for hemocyte collection, are indicated. For each biological replicate, discrete speeds of 20 hemocyte nuclei were averaged. **A**, mean cell velocity, determined by 30-min tracking, in various bathing solutions consisting in collected hemolymph, Marine Physiological Salt Solution (MPSS) or Marine Medium 199 (MM199) adapted to seawater osmolarity (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, Student's *t*-tests). **B**, 8-h continuous recording under repeated 377/50-nm UV excitation (a one-sec flash every 30 sec) at 14°C in MPSS (black circles) or in MM199 (open circles). Migration speeds significantly different from velocity at t=0 h in MPSS are indicated above (MM199) or under (MPSS) mean  $\pm$  SEM values (n=6, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, Student's *t*-tests). Notice that, under long term tracking, velocity suddenly decreases after 4 hours of uninterrupted experiment. **C**, hemocytes were collected from a single mussel and simultaneously plated at t=0 h in 6 distinct culture dishes maintained at 14°C in MM199. Culture dishes 1 to 6 were sequentially treated with Hoechst 33342 and submitted to successive 8-h UV illumination for nuclei tracking (vertical dashed lines). A 48-h motility monitoring was therefore reconstituted from the 6 consecutive 8-h long tracking sessions. Motility drops are evidenced after several hours of continuous recording. Initial migration speed rises with time in culture from 8 to 32 hours, relatively to cell velocity at t=0 (horizontal dashed line). **D**, comparison of mean velocities after 8 h of exposure to UV alone, Hoechst 33342 alone, a combination of UV and Hoechst dye relatively to the initial migration speed à t=0 h (control). Values significantly different from control are indicated (n=4, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, one-way ANOVA, Holm-Sidak post hoc).



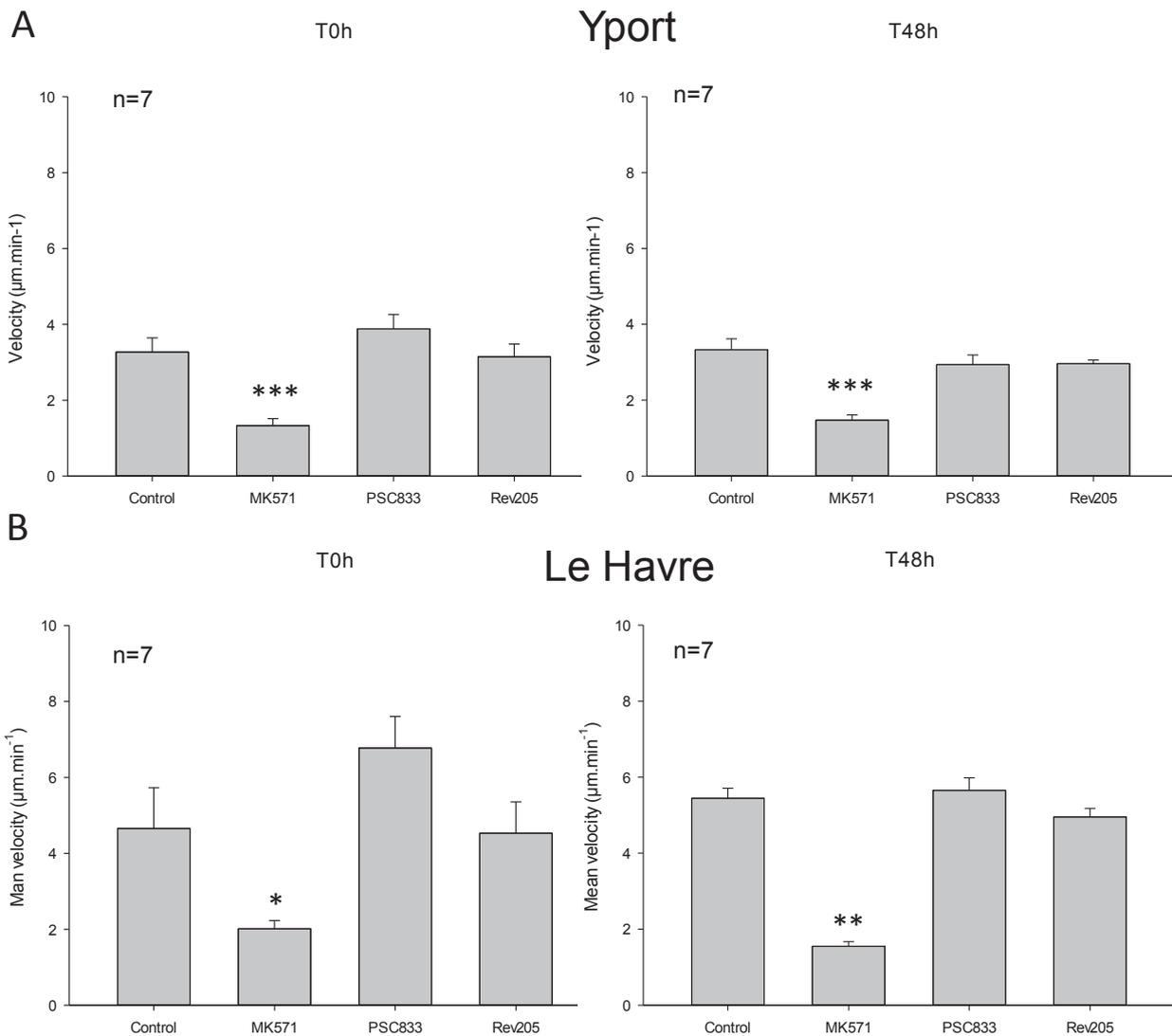
**Figure 5. Migration speed, metabolic activity and cell cycle phase distribution of hemocytes in primary culture.**

**A**, *Mytilus edulis* hemocytes were maintained in primary cultures at 14°C for 4 days in MPSS or MM199 medium. Mean cell velocity was daily determined after 30-min endpoint recordings as described in Figure 1B-C, by using a separated culture dish every day. **B**, evolution of mean velocity in primary cultures of hemocytes carried out during 12 days at 14°C in MM199. In that case, the medium was changed every 2 days. **C**, determination of changes in mitochondrial activity by measurement of MTT responses over time, expressed as a ratio  $\pm$  SEM to plating values response at day 0 (n=6). **D**, cell cycle analysis of hemocyte nuclei isolated and stained with NIM-DAPI. *Top panels*, single parameter histograms of DNA content at day 0 (*left*) and day 4 (*right*), for 20 000 nuclei. *Bottom table*, distribution of hemocytes cultured in MM199 within cell cycle phases over 4 days (n=4). For A, B and C, Statistical significance was determined by comparison to values at day 0 (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, Student's *t*-tests).



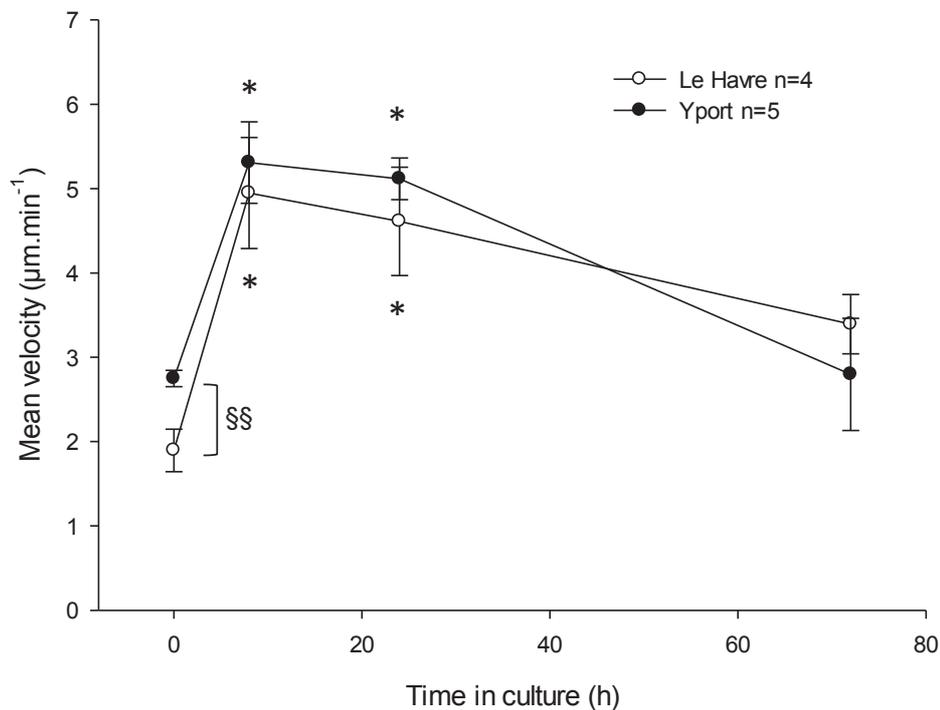
**Figure 6. Effect of temperature on hemocyte velocity.**

**A**, freshly collected hemocytes were deposited in a temperature-controlled recording chamber filled with MPSS. Bath temperature was changed in steps of 30 minutes, from 14 to 22 °C, and monitored (*upper trace*). Instantaneous velocity was computed from nuclei centroid XY coordinate changes in the microscopic field between two successive images, separated by 30 seconds, through out a 180 minutes time-lapse recording, as in the representative recording given here (*bottom trace*). Oscillations between 0 and 12 μm·min<sup>-1</sup>, increasing in amplitude but not in frequency with temperature, can be observed. **B**, distribution of hemocyte velocity in a population of 100 hemocytes at various temperatures. Single cell speeds were integrated from their migration course in 30-min time-lapse sequences and binned into 41 levels between 0 and 8 μm·min<sup>-1</sup> (bin width 0.2 μm·min<sup>-1</sup>). **C**, variation of mean velocity among replicates at various temperatures. Each experimental point corresponds to a biological replicate in which twenty individual hemocytes are recorded during 30 minutes. **D**, dependence of mean hemocyte velocity to temperature for  $n=6-12$  independent replicates. Statistical significance was determined by comparison to velocity at 14°C (\*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ , Student's *t*-tests).



**Figure 7. Effect of ATP Binding Cassette transporter inhibitors on hemocyte motility.**

Mean velocity of freshly withdrawn hemocytes was determined at 14°C, in MPSS, as presented in Figure 1B-C. Prior tracking, hemocytes at day 0 (*left*) or after 48 h of primary culture in MPSS (*right*) were exposed during 1 h to various ATP Binding Cassette transporter blockers used in vertebrates for their specificity towards ABCB/P-glycoprotein (PSC833 10  $\mu\text{M}$  ; Rev205 10  $\mu\text{M}$ ) or ABCC/Multidrug resistance Related Protein (MK571 30  $\mu\text{M}$ ) activities. Hemocytes were collected from mussels originating from Yport (A) or from the seaport of Le Havre (B). Values significantly different from control are indicated (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , Student's *t*-tests).



**Figure 8. Velocity of hemocytes collected from mussel originating from sampling sites with distinct chemical contaminations.**

Hemocytes collected from mussels originating from the rocky shore of Yport (black circles) or from the seaport of Le Havre (open circles) were cultured in MM199 at 14°C and used time to time to 30-min endpoint mean migration velocity recordings, as in Figure 5A. Migration speeds significantly different from velocity at t=0 h are indicated above (Yport) or under (Le Havre) mean  $\pm$  SEM values (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, Student's *t*-tests). Significant differences obtained according to mussel origins for equivalent culture times are also specified (§ p<0.05, §§ p<0.01, §§§ p<0.001, Student's *t*-tests).

# DISCUSSION

---

Au cours de la dernière décennie, la réponse immunitaire des bivalves a été largement explorée à différents niveaux d'organisation, notamment chez le genre *Mytilus*. Au niveau moléculaire, des informations détaillées concernant des voies de signalisation hémocytaires « classiques » ou des acteurs de l'immunité sont maintenant disponibles (Asokan, Arumugam *et al.*, 1997; Canesi, Betti *et al.*, 2002; Cao, Mercado *et al.*, 2003; Betti, Ciacci *et al.*, 2006); (Venier, De Pitta *et al.*, 2009; Venier, Varotto *et al.*, 2011; Zhang, Fang *et al.*, 2012). Au niveau cellulaire, un grand nombre de publications ont étudié certaines fonctions hémocytaires comme la phagocytose (Carballal, Lopez *et al.*, 1997c; Arumugam, Romestand *et al.*, 2000; Malagoli, Casarini *et al.*, 2007; Garcia-Garcia, Prado-Alvarez *et al.*, 2008; Malagoli, Casarini *et al.*, 2008), la production d'oxygène réactif ou espèces d'azote (Torreilles & Guerin, 1999; Arumugam, Romestand *et al.*, 2000; Gomez-Mendikute, Etxeberria *et al.*, 2002; Novas, Cao *et al.*, 2004; Novas, Barcia *et al.*, 2007), la résistance multi-xénobiotiques (Minier & Moore, 1996; Minier & Moore, 1998; Marin, Legros *et al.*, 2004; Della Torre, Bocci *et al.*, 2013) ou de l'activité lysosomale (Canesi, Ciacci *et al.*, 2003; Betti, Ciacci *et al.*, 2006). Ces fonctions ont également été utilisées pour évaluer l'état de l'ensemble du système immunitaire, au niveau intégré, chez les animaux injectés avec des bactéries (Hernroth, 2003; Parisi, Li *et al.*, 2008; Tanguy, McKenna *et al.*, 2013), ou exposés à des polluants au laboratoire (Zaja, Klobucar *et al.*, 2006; Duchemin, Auffret *et al.*, 2008), ainsi que dans divers sites contaminés (Auffret, Rousseau *et al.*, 2006; Akaishi, St-Jean *et al.*, 2007). Dans ces études, les hémocytes sont généralement considérés comme un ensemble homogène de cellules.

Cependant, plusieurs sous-populations ont été décrites chez la moule, principalement sur la base de différences morphologiques après observation microscopique des cellules (Moore & Lowe, 1977; Cajaraville & Pal, 1995; Carballal, Lopez *et al.*, 1997b) ou, plus récemment, de l'analyse en cytométrie en flux de suspensions cellulaires dispersées (Cao, Mercado *et al.*, 2003; Garcia-Garcia, Prado-Alvarez *et al.*, 2008; Parisi, Li *et al.*, 2008) et cela en l'absence de marqueur cellulaire ou moléculaire disponible.

## ***I Les différents types d'hémocytes (ARTICLE 1)***

Dans un contexte où la classification des hémocytes de mollusques est sujette à débat, nous avons introduit un paramètre supplémentaire : le temps. L'intégration de ce paramètre dans l'étude de la morphologie des hémocytes permet de contribuer à leur identification et à une meilleure compréhension de leurs fonctions.

Corrélée à la vidéomicroscopie dynamique, la coloration de type Giemsa (azur de méthylène et éosine, en kit Merck Hemacolor) sur cellules fixées, permet d'identifier 3 sous-populations : des granulocytes éosinophiles, des hémocytes basophiles et des hyalinocytes. La première population a été identifiée en fonction de la structure interne des cellules. Dans ces cellules, les granules sont toujours abondants, de petite taille et colorés en rouge vif. Les éosinophiles sont étalés sur le substrat, englobant une aire relativement grande. En revanche, les basophiles couvrent une plus petite surface. Leur cytoplasme présente une coloration bleue caractéristique avec des granules bleu profond. Fréquemment, des protubérances membranaires ressemblant à des filopodes courts et épais sont observées. Les hyalinocytes diffèrent des éosinophiles et des basophiles principalement par l'absence de granules colorés avec un cytoplasme clair. Cependant, une coloration cytologique rouge ou bleue extrêmement pâle peut parfois être perçue. D'importantes vacuoles prénucléaires sans affinité avec les colorants sont présentes dans une grande majorité de ces cellules. Leur surface d'étalement est souvent supérieure à la surface occupée par les éosinophiles. De manière concordante avec nos résultats, les éosinophiles ont été décrits dans les moules (Moore & Lowe, 1977 ; Carballal, Lopez *et al.*, 1997b). Les granulocytes ont également été décrits dans d'autres travaux (Cajaraville & Pal, 1995 ; Garcia-Garcia, Prado-Alvarez *et al.*, 2008), mais sans les informations concernant la nature exacte, acidophiles ou non, des granules. Alors que les basophiles et les hyalinocytes sont clairement décrits dans la littérature, leur identification semble quelque peu confuse. Selon Carballal *et al.*, (1997b), par exemple, les hyalinocytes sont plus petits que les granulocytes et certains d'entre eux contiennent de petites granulations basophiles. Dans nos travaux, ces cellules ont été appelées basophiles, alors qu'elles correspondent certainement aux hémoblastes pour d'autres auteurs (Bettencourt, Dando *et al.*, 2009). En fait, selon le degré de priorité accordé par les auteurs à la coloration, la forme ou l'abondance des granules, des cellules équivalentes sont apparemment décrites comme hyalinocytes ou basophiles. D'un point de vue morphologique notre vision des différents types cellulaires est en accord avec les observations de (Bettencourt, Dando *et al.*, 2009) chez une espèce moule abyssale associée aux sources hydrothermales : *Bathymodiolus azoricus*.

Les micrographies d'hémocytes, obtenues en contraste de phase, présentée dans ces travaux correspondent aux 3 populations que nous avons pu identifier chez *Mytilus edulis*. Cependant, la capacité de ces cellules à modifier rapidement leur morphologie impose d'exclure véritablement toute identification fondée sur la forme et la taille des hémocytes adhérents vivants ou fixés.

La situation est toutefois moins problématique en cytométrie en flux, car *i/* les cellules adoptent une forme plus régulière et plus sphérique lorsqu'elles sont en suspension et *ii/* la quantification des paramètres morphologies est moins subjective. A partir de l'analyse des sous-populations hémocytaires de moules en cytométrie en flux, différents auteurs ont proposé de distinguer soit deux (Moore & Lowe, 1977), soit trois (Parisi, Li *et al.*, 2008), soit quatre (Garcia-Garcia, Prado-Alvarez *et al.*, 2008) sous-populations distinctes. Dans notre cas, nous avons séparé au plus trois sous-types bien définis selon les critères volume couler (EV) / complexité (SS).

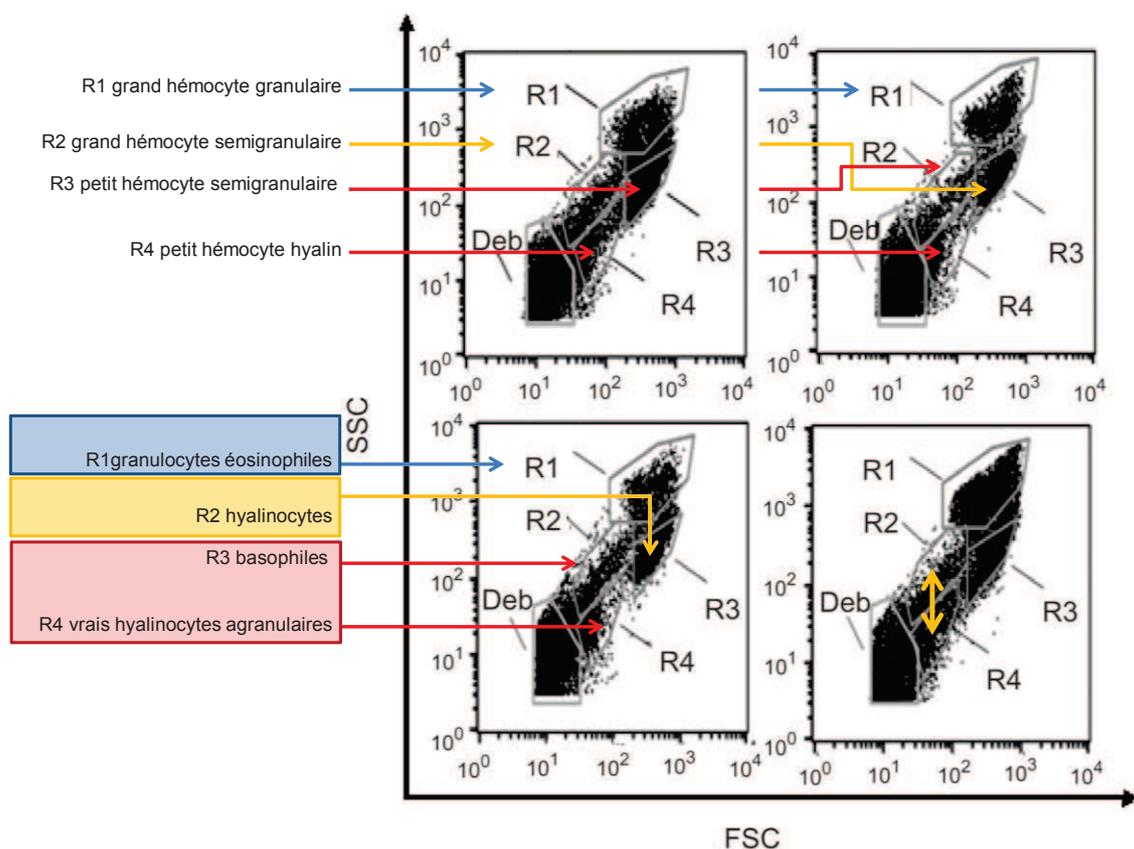
Concernant le type cellulaire 1, la quantification de fluorescence de l'éosine dans des cellules fixées suggère que les cellules les plus grandes et les plus complexes sont les éosinophiles granulocytes. Cette région comprend également les cellules présentant l'activité phagocytaire la plus élevée. Elle correspond probablement aux grandes cellules granuleuses. Dans leur étude datant de 2008, Garcia-Garcia *et al.* ont analysé des hémocytes de *Mytilus galloprovincialis* fixés au paraformaldéhyde selon leur taille (FSC) et leur complexité (SS), puis les ont physiquement séparés grâce à un module trieur-concentrateur et enfin les ont micrographiés après coloration Hemacolor. Ces auteurs nomment R1 la région du cytogramme regroupant les cellules granulaires de grande taille, les granulocytes éosinophiles, qu'ils qualifient de phagocytes «professionnels» (**Figure 35**).

Dans nos expériences, les petites cellules séparées dans la région 3 du nuage de points EV / SS affichent des diamètres en suspension entre 7 et 7,5  $\mu\text{m}$ , tout à fait comparables aux diamètres des basophiles observés après fixation ou en microscopie en contraste d'Hoffmann. En conséquence, les basophiles analysés en région 3 correspondraient aux cellules que Garcia-Garcia *et al.* identifient comme de petites cellules semigranulaires (incorrectement placées dans R3, devant en fait correspondre à R2 sur leurs cytogrammes) et aux cellules agranulaires (vrais petits hyalinocytes, éventuellement hémoblastiques) nommés R4 par Garcia-Garcia *et al.* (**Figure 35**).

Enfin, la sous-population hémocyttaire la plus hétérogène, le type 2, correspond vraisemblablement aux hyalinocytes, grandes cellules semigranulaires (R3 après correction, chez Garcia-Garcia *et al.*). En suspension dans le cytomètre, les hyalinocytes sont

probablement d'une taille comparable aux éosinophiles mais avec une complexité plus faible expliquée par l'absence de granules. Dans cette région EV/SS, la séparation des populations cellulaires a cependant la particularité d'être fluctuante. En effet, dans certains cas, nos échantillons d'hémolymphe ne présentent clairement que deux sous-populations d'hémocytes séparées et distinctes, ségréguées dans les régions 1 et 3 des cytogrammes.

Dans certaines situations physiologiques, les cellules de grande taille connaissent donc des changements cytologiques, très certainement en termes de complexité, à l'origine du dépeuplement ou du repeuplement de la région 2. Parmi les hypothèses possibles, il est envisageable de considérer qu'en présence de micro-organismes pathogènes, des hémocytes peu complexes présentent un volume cellulaire accru, causé par la présence de phagosomes, et sont séparés dans la région 2 (R3 chez Garcia-Garcia *et al.*). La présence de cellules dans la région 2 des cytogrammes en EV/SS signerait donc une contamination bactérienne des moules. Ce point devra faire l'objet des investigations complémentaires.

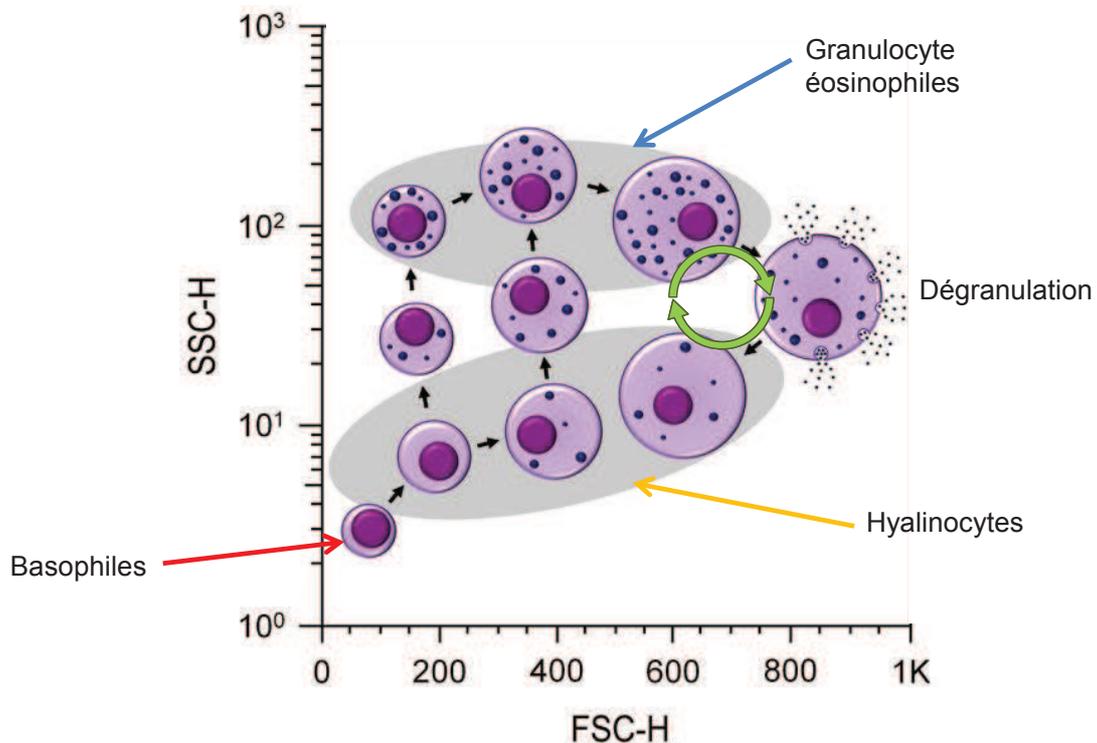


**Figure 35. Distribution des sous populations hémocytaires dans les cytogrammes FSC/SS selon Garcia-Garcia *et al.*, 2008.**

Les deux premiers cytogrammes reprennent la dénomination utilisée par l'auteur (respectivement : sans et avec correction). Les deux derniers graphiques présentent notre vision de la classification avec le flux bidirectionnel des hyalinocytes entre les régions R2 et R4. Le code couleur utilisé dans notre article 1 est respecté.

Très récemment (Rebello, Figueiredo *et al.*, 2013) a proposé un modèle expliquant la distribution cytométrique des différentes sous-populations d'hémocytes chez l'huitre *Crassostrea rhizophorae*. Ce modèle repose en partie sur la rotation de deux populations : les granulocytes et les hyalinocytes. Ainsi, les granulocytes deviendraient hyalinocytes après dégranulation et les hyalinocytes, granulocytes après régénération des granules. Bien que proposé chez l'huitre, ce modèle semble applicable chez *Mytilus sp.* (**Figure 36**) et prend en compte l'état physiologique du système immunitaire. Ainsi dans le cas d'individus sains seulement deux populations sont observables : les granulocytes et les basophiles.

Si l'on accepte le schéma de Rebello *et al.*, la question de la fonction et de la place des petites cellules (en référence aux volumes en suspension) basophiles dans la population des hémocytes reste entière. Deux hypothèses peuvent être proposées. Les cellules de la région 3 du cytogramme pourraient constituer un sous-type d'hémocytes à part entière, ayant une origine, une fonction, un cycle et une durée de vie distincts des granulocytes/hyalinocytes. Alternativement, les basophiles pourraient constituer des précurseurs des grandes cellules (à l'instar des hémoblastes parfois évoqués dans certains travaux), qui migreraient vers la région 2 puis 1 à mesure qu'ils se chargeraient en phagosomes ou en granules.



**Figure 36. Modèle expliquant la répartition des hémocytes de *Mytilus edulis* en cytométrie en flux.**

*Adaptation du modèle de (Rebello, Figueiredo et al., 2013) aux hémocytes de Mytilus. Ce modèle reprend la rotation hyalinocytes/granulocytes éosinophiles. Le code couleur utilisé dans notre article 1 est respecté.*

En outre, il faut garder à l'esprit que les bivalves possèdent un système circulatoire ouvert. L'absence de gaine endothéliale facilite probablement l'infiltration des tissus par les hémocytes (Shigei, Tsuru *et al.*, 2001). L'équilibre entre hémocytes résidents dans les tissus (non prélevés donc non analysés) et hémocytes circulants dans l'hémolymphe varie certainement en fonction des saisons (Cajaraville, Olabarrieta *et al.*, 1996) et de l'état physiopathologique des animaux (Hughes, Smith *et al.*, 1991a).

En plus de la cytochimie classique et de la cytométrie, dans notre travail, les sous-populations d'hémocytes ont été distinguées en fonction de leur motilité, une notion qui inclut les déformations et les changements de volume cellulaires, les interactions hémocyte/hémocyte, et la migration des cellules.

Les déformations de la membrane des basophiles sont essentiellement caractérisées par la présence de nombreux filopodes ondulant à partir d'un corps cellulaire condensé et sphérique. La structure du cytosquelette d'actine ainsi que l'examen des enregistrements en time-lapse donnent des détails sur la dynamique de la membrane des basophiles. Dans les cellules marquées avec la phalloïdine conjuguée au FITC, un réseau d'actine dense s'organise radialement à l'intérieur des basophiles, à l'inverse des grandes cellules étalées qui présentent une répartition de l'actine périphérique. Ces différences dans l'organisation du cytosquelette d'actine dans les sous-types hémocytaires de moules ont déjà été rapportées (Gomez-Mendikute, Etxeberria *et al.*, 2002). L'utilisation des filopodes en « pagaies », permet aux basophiles de « ramer » et ainsi de glisser sur le substrat. Ce mode de mouvement n'est pas commun et ressemble à la locomotion non-amiboïde des cellules microgliales provenant des rats nouveau-nés (Haapaniemi, Tomita *et al.*, 1995). La deuxième caractéristique frappante des basophiles est leur capacité à résider sur des cellules étalées. Cette caractéristique les rend très difficiles à distinguer en microscopie, et est très certainement à l'origine d'importantes erreurs de numération et des difficultés rencontrées dans les tentatives de séparation des populations d'hémocytes par centrifugation isopycnique. L'imagerie du cytosquelette d'actine associée à une contre-coloration des noyaux permet la détection fiable des basophiles situés sur des cellules étalées. De même que les enregistrements en time-lapse, révèlent les mouvements typiques de filopodes trahissant leur positionnement au-dessus de la membrane des cellules étalées sur le substrat.

La survenue aussi fréquente de ces contacts cellulaires suggère fortement l'existence d'interactions fonctionnelles entre les hémocytes de moules. Ces interactions entre cellules

peuvent également être visualisées à l'aide du WGA (une lectine), suggérant que les motifs moléculaires glucidiques peuvent être impliqués dans les interactions cellule-cellule entre hémocytes (Bettencourt, Dando *et al.*, 2009). Ces contacts cellulaires rappellent étonnamment la synapse immunologique décrite initialement par (Norcross, 1984). Dans une immunité bimodale, ces synapses immunologiques ont en partie pour rôle de faire le pont entre l'immunité innée et l'immunité acquise. Les signaux échangés entre les cellules T et les Cellules Présentatrices d'Antigène (CPA) sont générés dans une zone de contact spécifique, dite "synapse immunologique", qui coordonne la dynamique du cytosquelette avec le récepteur des cellules T (TCR), l'engagement de récepteurs accessoires et de la signalisation à la membrane proximale. Des données récentes mettent en lumière les différents phénomènes physiques et moléculaires qui se produisent pendant l'interaction entre les cellules T et les CPA, y compris leur dynamique et les étapes de transition, ainsi que leurs conséquences sur la signalisation, l'activation et la fonction des cellules T effectrices (Friedl & Storim, 2004 ; Bertrand, 2010).

Les basophiles, non seulement interagissent avec les cellules étalées, mais aussi avec d'autres basophiles pour former des agrégats. Systématiquement le centre des agrégats est constitué d'un noyau de basophiles couronné d'éosinophiles granulocytes « entrants » et « sortants » de l'agrégat. Il convient de mentionner que, jusqu'à présent, la signification physiologique des propriétés agrégatives des basophiles n'est pas précisément documentée, de même que la fonction de ces agrégats. Les hypothèses les plus courantes proposent que ces structures agrégatives pourraient intervenir dans des mécanismes immuns tels que l'encapsulation d'un pathogène ou la formation d'un clou hémocytaire (Chen & Bayne, 1995a ; Lavine & Strand, 2002 ; Jiravanichpaisal, Lee *et al.*, 2006). De façon tout à fait spéculative, on peut postuler que ces interactions entre hémocytes pourraient participer à une forme de sélection clonale à l'origine de la sécrétion de FREP ou de peptides antimicrobiens spécifiques.

## **II. Motilité en culture (ARTICLE 2 et 4)**

### **B. Comportement des hémocytes à la mise en culture**

Dans ces études, une attention toute particulière a été apportée à la concentration en hémocytes des échantillons d'hémolymphe frais. Afin de dénombrer la quantité volumique de cellules tout en limitant les biais dûs notamment à la présence d'agrégats dans les chambres de comptage, une méthode indirecte a été utilisée : la mesure de l'activité mitochondriale par test colorimétrique au MTT. Les réponses obtenues sur 99 prélèvements consécutifs montrent une forte variabilité indicatrice de concentrations en hémocytes très dissemblables d'un échantillon d'hémolymphe à l'autre. Cette variabilité peut s'expliquer par des différences interindividuelles en nombre total d'hémocytes (THC : Total Hemocyte Count) ou en distribution tissulaire entre cellules infiltrées et cellules en circulation comme cela l'a été suggéré à plusieurs reprises (Hughes, Smith *et al.*, 1991a ; Cajaraville & Pal, 1995 ; Li, Parisi *et al.*, 2008; Höher, Köhler *et al.*, 2012 ). Cette variabilité peut aussi révéler une mauvaise reproductibilité technique du prélèvement par ponction dans le muscle adducteur postérieur. Cependant, dans nos expérimentations, la DO MTT varie très linéairement avec les volumes d'hémolymphe déposés pour chaque échantillon. Ainsi le test MTT en tant que test métabolique peut être utilisé pour suivre la viabilité relative des cultures d'hémocytes si et seulement si les résultats sont exprimés en variation de la réponse par rapport à la valeur initiale à la mise en culture.

Les hémocytes de *Mytilus edulis* possèdent la particularité de se mettre en mouvement spontanément après l'attachement au substrat, qui survient dans les secondes qui suivent la mise en culture (ARTICLE 2). Dans ce travail de thèse, nous avons développé une méthode permettant de suivre la motilité de plusieurs cellules pendant quelques jours *in vitro*. Cette méthode permet, pour la première fois, de mesurer la vitesse de migration des hémocytes en culture. La vitesse moyenne initiale de migration est de 2,78  $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$  à 14°C dans l'eau de mer artificielle. Cette vitesse est similaire aux vitesses relevées pour les neutrophiles extravasculaires humains *in vivo* (2,88  $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ ) à 37°C (Kreisel, Nava *et al.*, 2010). Dans un milieu de culture enrichi comme le MM199, les vitesses initiales sont légèrement supérieures à 3  $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ , mais restent plus faibles que celles observées dans l'hémolymphe pure ou la moyenne des vitesses atteint 3,6  $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ . Il existe probablement, dans l'hémolymphe, des facteurs chimiokinétiques solubles capables de stimuler l'activité migratrice des cellules.

Chez les mollusques, on en sait peu sur les mécanismes impliqués dans la régulation de la motilité des immunocytes. Quelques mesures chimiotactiques ont néanmoins été effectuées sur des hémocytes de bivalves, après stimulation par des produits bactériens, (Ford, Kanaley *et al.*, 1993 ; Schneeweiss & Renwranz, 1993 ; Fawcett & Tripp, 1994 ; Lopez-Cortes, Castro *et al.*, 1999). Ces études révèlent que les hémocytes sont capables de migrer vers des bactéries et produits bactériens, pathogènes ou non. Cheng & Howland (1979) ont démontré que les hémocytes d'huîtres ne sont attirés que par les bactéries vivantes, ce qui suggère que les chimioattractants sont des molécules sécrétées par les cellules vivantes. Des petites protéines sécrétées par les bactéries ont été décrites comme chimioattractants pour les hémocytes de *Crassostrea virginica* (Howland & Cheng, 1982), et de *Mercenaria mercenaria* (Fawcett & Tripp, 1994). Schneewieb & Renwranz (1993) ont suggéré l'implication du lipopolysaccharide bactérien dans le chimiotactisme des hémocytes de *Mytilus edulis*, mais leurs observations peuvent correspondre à une chimiokinèse plutôt qu'à de la chimiotaxie.

Plus récemment, deux études transcriptomiques indépendantes, réalisées chez *Mytilus*, ont récemment identifié une cytokine hautement conservée et impliquée dans le contrôle de la migration des immunocytes : le macrophage migration inhibitory factor (MIF) (Venier, Varotto *et al.*, 2011; Philipp, Kraemer *et al.*, 2012 ). Toutefois, plus de données existent dans d'autres organismes, des phénomènes chimiotactiques ont été, par exemple, décrits dans les hémocytes de crevettes (Yip, Wong *et al.*, 2001). Chez les insectes, la propagation des hémocytes et leur activation s'effectuent par un peptide de 23 acides aminés sécrétés par les plasmatocytes (Clark, Pech *et al.*, 1997 ; Clark, Volkman *et al.*, 2001). Chez les mammifères, les chimiokines régulent l'activité motile des neutrophiles et macrophages (Luu, Rainger *et al.*, 2000 ; Luster, 2001 ; Townson & Liptak, 2003 ; Le, Zhou *et al.*, 2004 ). Certains peptides endogènes possèdent une activité chimioattractante, c'est le cas des facteurs du complément C3a et C5a, du leucotriène B4, du facteur d'activation plaquettaire (PAF), du PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), de certaines interleukines ou encore du TGF- $\beta$  (Luu, Rainger *et al.*, 2000 ; Le, Zhou *et al.*, 2004 ). D'autres sont exogènes comme le fMLP (Ebrahimzadeh, Högfors *et al.*, 2000), ou le LPS, qui toutefois ne possède pas directement une capacité chimioattractante mais induit la sécrétion de chimiokines (Bandow, Kusuyama *et al.*, 2012).

### C. Décours temporel de l'activité hémocytaire *in vitro*

Nos mesures de motilité ont été poursuivies dans un milieu de culture plutôt que dans l'hémolymphe pure pour deux raisons principales.

- En primoculture, les hémocytes fraîchement prélevés sont déposés au centre des boîtes de culture puis le niveau est complété avec une solution extracellulaire (typiquement 2 mL). Pour des cultures en hémolymphe, il est nécessaire de prélever plusieurs moules, d'assembler les hémolymphe, de culotter les cellules par centrifugation et de congeler les surnageants. La quantité d'hémolymphe pure à ajouter est dans ce cas trop importante pour envisager les cultures répétées.

- La présence des facteurs chimiokinétiques de l'hémolymphe est très probablement variable en fonction de l'état de la physiologie des individus. Ceci ajoute une variable non maîtrisée à la culture cellulaire.

Nos résultats indiquent que les hémocytes de *Mytilus edulis* peuvent être maintenus en culture au moins 4 jours dans un milieu salin de base (MPSS) avec des vitesses de migration supérieures à  $2 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$  et des activités métaboliques mesurées au MTT comparables aux valeurs obtenues à la mise en culture. Au-delà de cette période, l'analyse du cycle cellulaire indique que le pourcentage de cellules en phase G0/G1 chute en dessous de 50 % et que la quantité de corps hypoploïdes/apoptotiques dépasse 20 % (ARTICLE 4). Dans les cultures primaires de plus de 8 jours avec un milieu formulé à partir de M199, la vitesse de migration chute sous  $1 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ , ce qui indique probablement que la viabilité des hémocytes est largement altérée, même si des hémocytes sont manifestement encore vivants. Ces résultats sont assez différents de ceux précédemment obtenus au laboratoire (Marin, 2005), où le pourcentage de l'activité métabolique mesurée au MTT après 18 jours de culture dans un milieu L-15 modifié atteignait encore plus de 50% de la valeur initiale à la mise en culture.

Quelque soit le milieu de culture utilisé, les vitesses initiales enregistrées au début de la culture augmentent transitoirement pour culminer autour de  $4,5 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$  après 24/48 h après mise en culture. Certaines cellules présentent des vitesses plus rapides, atteignant  $7 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ . Cette accélération pourrait être attribuée à une activation des hémocytes, évocatrice d'une réaction inflammatoire, après prélèvement et mise en culture. Cette hypothèse est étayée par l'augmentation transitoire et simultanée de l'activité mitochondriale révélée par des tests MTT. De telles augmentations du métabolisme mitochondrial sont également observées dans les neutrophiles humains activés en culture par les esters de phorbol ou le TNF $\alpha$  (Oez, Platzer *et al.*, 1990; Oez, Welte *et al.*, 1990). En outre, l'analyse du cycle

cellulaire en cytométrie en flux durant toute la culture ne montre pas d'hémocytes engagés dans la mitose. Cette observation permet d'écarter la prolifération cellulaire comme cause du pic MTT.

Ainsi la mise en culture des hémocytes et/ou leur ancrage au substrat induisent très probablement une activation des hémocytes associant une augmentation de la motilité et un accroissement du métabolisme oxydatif. Chez les mammifères, les cellules immunitaires sont connues pour migrer rapidement vers le site de l'infection (Abadie, Badell *et al.*, 2005 ; Chtanova, Schaeffer *et al.*, 2008 ; Germain, Robey *et al.*, 2012). De façon intéressante, la vitesse de migration des hémocytes au pic atteint  $8 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$  à  $14^{\circ}\text{C}$ , une valeur comparable à celle rapportée lors de la migration des neutrophiles humains à  $37^{\circ}\text{C}$  dans les tissus interstitiels des sites d'inflammation (Graham, Zinselmeyer *et al.*, 2009 ; Kreisel, Nava *et al.*, 2010). De plus, une étude récente indique que les hémocytes migrent dans le muscle adducteur de *Mytilus galloprovincialis* après injection de *Vibrio splendidus* LGP32 (Li, Parisi *et al.*, 2008). Cette étude confirme que la fonction migratrice des hémocytes est induite par les infections microbiennes et *a fortiori* par l'inflammation.

#### **D. Régulation de la vitesse de déplacement des hémocytes**

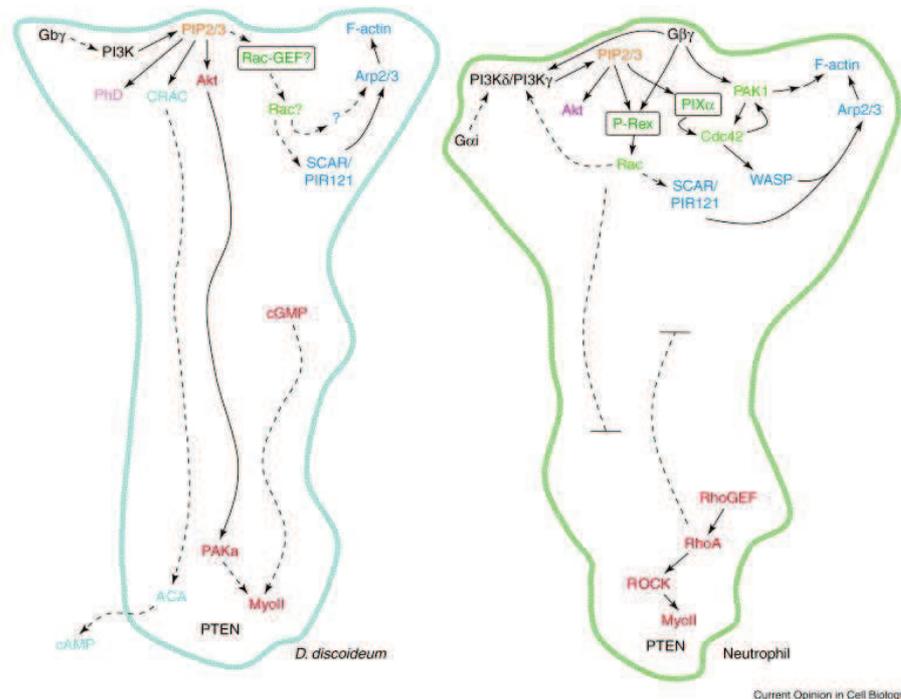
La motilité des hémocytes est aussi influencée par la température. L'exposition des cultures cellulaires à des températures croissantes montre une augmentation globale des vitesses moyennes populationnelles (ARTICLE 4). A côté des pures raisons thermodynamiques expliquant l'augmentation de la vitesse des réactions enzymatiques selon la loi d'Arrhénius, il a été montré que les protéines sensibles à la température (HSP) étaient capables d'activer le système immunitaire chez les vertébrés et d'induire la production de chimiokine C-C (Wallin, Lundqvist *et al.*, 2002 ; Tsan & Gao, 2009).

L'enregistrement continu des mouvements cellulaires à des températures variant en paliers selon le cycle  $14^{\circ}\text{C}$ - $18^{\circ}\text{C}$ - $22^{\circ}\text{C}$ - $14^{\circ}\text{C}$  révèle une oscillation des noyaux dont la fréquence augmente avec la température. La littérature actuelle ne relate pas de faits similaires concernant les noyaux. Seules quelques publications décrivent des oscillations notamment dans des cellules immunitaires sans pour autant discuter d'une fonction possible (Pletjushkina, Rajfur *et al.*, 2001 ; Paluch, Piel *et al.*, 2005 ; Salbreux, Joanny *et al.*, 2007 ; Costigliola, Kapustina *et al.*, 2010). De façon surprenante, ces oscillations corticales sont indépendantes du calcium. Elles sont dues à une déstabilisation des microtubules régulés par

RhoA (Costigliola, Kapustina *et al.*, 2010). Ces mêmes auteurs montrent une fréquence d'oscillation à 0,01 Hz alors que les hémocytes oscillent plus lentement, à 0,005 Hz. Quoiqu'il en soit, ce phénomène révèle le haut dynamisme du cytosquelette des hémocytes.

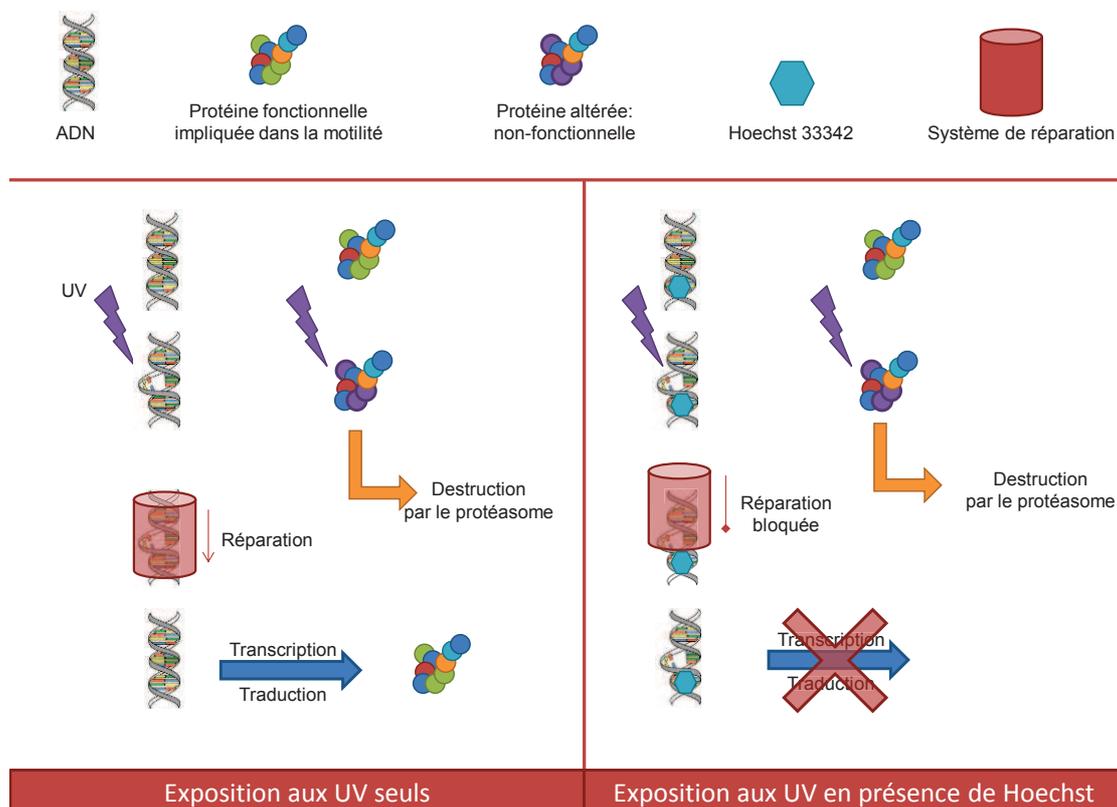
L'élévation de la température des cultures conduit à une dispersion des vitesses. Étant donné que (1) les noyaux sont sélectionnés au hasard pour le suivi de la cellule et (2) que les hémocytes sont capables de changements de forme rapides, nous considérons que ces différences ne peuvent pas être définitivement attribuées à la présence de petits basophiles moins mobiles. D'autres explications doivent être prises en compte comme les niveaux d'activation des cellules par exemple.

Le clonage de CDC 42 chez *Mytilus edulis* montre que les mécanismes régissant la motilité sont différents de ceux de l'amibe où CDC42 n'existe pas. De même que RhoA est présent chez *Mytilus sp.* (Tomanek & Zuzow, 2010) et absent chez *Dictyostelium* (Wherlock & Mellor, 2002). La **Figure 37** présente les différents acteurs moléculaires de la motilité cellulaire chez l'amibe et chez le neutrophile. Vraisemblablement, les voies de signalisation impliquées dans les déplacements des hémocytes de *Mytilus edulis* sont très proches de celles connues dans les neutrophiles et les cellules dendritiques des vertébrés.



**Figure 37. Comparaison des acteurs moléculaires chez l'amibe et le neutrophile.** Les événements de signalisation dans les cellules polarisées sont indiqués pour de *D. discoideum* à gauche et pour les neutrophiles à droite. Le bord d'attaque des cellules est en haut de la figure. Les lignes pointillées représentent les voies qui n'ont pas encore été pleinement caractérisées. D'après (Parent, 2004).

L'exposition aux rayonnements ultraviolets, inhérente à notre méthode d'imagerie, perturbe la motilité si l'illumination dépasse trois heures consécutives à raison d'un flash de 1 seconde toutes les 30 secondes. Les UV sont connus pour altérer l'ADN (Sinha & Häder, 2002) et les acides aminés (Svobodova, Walterova *et al.*, 2006). Le très fort effet potentialisateur du Hoechst 33342, qui se fixe dans le petit sillon de l'ADN (Portugal & Waring, 1988) et qui n'a pas d'effet sur la motilité même à long terme en l'absence de lumière UV, suggère fortement un mécanisme génotoxique. Le temps très court d'apparition de l'effet phototoxique (dès 3h) est compatible avec un effet perturbateur de la machinerie de transcription et/ de traduction de protéines impliquées dans la motilité et au turn-over très rapide. L'une des hypothèses qu'il est possible de formuler est donnée dans la **Figure 38**. Il est aussi intéressant de noter que certains acteurs de la motilité sont sensibles à la lumière : Rac1 est photoactivable et suffit à lui seul pour induire un lamellipode (Ridley, 2011).



**Figure 38. Effets synergiques des UV et du Hoechst 33342.**

*Ce schéma propose un mécanisme aboutissant à l'arrêt de la migration des hémocytes par effet phototoxique et génotoxique. Les UV détériorent protéines et ADN. Les protéines sont éliminées tandis que les systèmes de réparation réparent le génome afin de traduire de nouvelles protéines fonctionnelles. En présence de Hoechst33342, les systèmes de réparation ne peuvent agir efficacement, la transcription des protéines est perturbée.*

La migration des hémocytes dépend de la réorganisation du cytosquelette, du transport d'ions, du recyclage de la membrane par endocytose et de la formation de sites d'adhésion focale avec la matrice extracellulaire (Koutsogiannaki & Kaloyianni, 2010). Les hémocytes de mollusques sont impliqués dans la synthèse du collagène et le dépôt de la matrice extracellulaire (Serpentini, Ghayor *et al.*, 2000 ; Fleury, Serpentine *et al.*, 2011). Des études dans des sections de téguments d'espèces bivalves suggèrent que la matrice extracellulaire contient des collagènes similaires au type I, IV, V et VI (Corbetta, Bairati *et al.*, 2002). La capacité des hémocytes à synthétiser des molécules de collagène n'est pas étonnante compte tenu de leur rôle dans le processus de cicatrisation des plaies chez plusieurs espèces (Acosta-Salmón & Southgate, 2006 ; Wood, Faria *et al.*, 2006). Il est plus surprenant d'observer un tel niveau de transcrits correspondant au collagène dans les hémocytes circulants (Serpentine, Ghayor *et al.*, 2000). Physiologiquement les hémocytes s'infiltrer sur le site de la blessure pour exprimer spécifiquement certains gènes tels que le collagène de type IV afin de réparer les tissus en réponse à certains facteurs de croissance (Franchini & Ottaviani, 2000). Le collagène de type IV a été montré pour favoriser la fixation des cellules (Timpl & Dziadek, 1986 ; Hostikka & Tryggvason, 1988). Il a également été suggéré que les hémocytes de *M. galloprovincialis* adhèrent au collagène avec la participation de l'intégrine  $\alpha 2$  (Koutsogiannaki & Kaloyianni, 2011). Chez cette même espèce, la migration des hémocytes sur des protéines de la matrice extracellulaire (ECM) est altérée par les métaux lourds (Koutsogiannaki & Kaloyianni, 2010) et l'interleukine IL-8 (Ottaviani, Franchini *et al.*, 2000). Dans nos cultures, nous avons pu observer un changement d'aspect du fond des boîtes de pétri utilisées, sans pour autant avoir mis en évidence un élément d'une matrice extracellulaire. Ainsi l'hypothèse de la sécrétion du collagène par les hémocytes après la mise en culture est tout à fait envisageable car (1) l'accélération des cellules 24-48h après la mise en culture peut s'expliquer par la synthèse d'une matrice extracellulaire favorisant la migration et (2) nous avons pu constater qu'un nombre insuffisant de cellules à la mise en culture ne permettait pas d'obtenir une culture viable. Ce dernier point peut laisser penser que la sécrétion de cytokines ou d'une matrice extracellulaire peut favoriser la survie à long terme de toute la population en culture.

Nous sommes les premiers à proposer une étude quantitative de la motilité hémocytaire chez des invertébrés. Jusqu'à présent la littérature ne proposait pas de résultat liant les vitesses de déplacement et les conditions de vie environnementale de ces organismes poïkilothermes. Nous avons déjà montré et discuté de l'effet de la température sur la

migration des hémocytes. L'étude comparée de la motilité des hémocytes de moules collectées sur deux sites distincts apporte des éléments supplémentaires. Les cellules collectées sur de animaux vivants dans le port du Havre (site impacté par la pollution) se déplacent plus rapidement que celles issues d'Yport (site de référence). Cependant, cette distinction ne peut s'observer qu'à T0, à la mise en culture. Après 24h, les profils de cinétique sont comparables quel que soit le site de prélèvement. Il est tout à fait envisageable que les facteurs de régulation physiologique soient plus puissants que les facteurs environnementaux. Le développement d'un test utilisant la motilité cellulaire pour évaluer la qualité de l'air a déjà été proposé (Laval-Gilly, Falla *et al.*, 2000). Ce test utilise des THP-1 une lignée humaine de monocytes capables de se déplacer après activation. Ces cellules sont exposées à un gaz puis soumises à un gradient de chimioattractant, le fMPL. Les résultats décrits par Laval-Gilly *et al.* montrent des diminutions de la motilité de 79% et 90% après une incubation de 10 min. à 0,1 et 0,5 ppm d'ozone. Il est tout à fait envisageable que la motilité des hémocytes de *M. edulis* puisse être utilisée comme bioindicateur de la qualité de l'eau *in situ* par prélèvement de l'hémolymphe, mais aussi *in vitro* en utilisant des milieux de cultures additionnés d'eau à tester.

D'un point de vue fonctionnel, les hémocytes sont comparables aux neutrophiles des vertébrés qui représentent environ 50–70% des cellules immunitaires circulantes. Les neutrophiles sont normalement trouvés dans le flux sanguin (où leur durée de vie est de 7h) ou infiltrés dans les tissus (pendant 2-3 jours). Ces cellules consacrent leur temps de vie très court à la surveillance et constituent la première ligne de défense du système immunitaire inné (Quinn & Gauss, 2004). Dans le cas d'un processus inflammatoire, on observe une durée de vie allongée, une mobilité accrue, une capacité à infiltrer les tissus augmentée et une capacité phagocytaire stimulée (Freitas, Lima *et al.*, 2009).

### **III. MXR et ABC transporteurs (ARTICLE 3)**

#### **A. Activité basale d'efflux**

Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction, l'activité de détoxification des cellules repose en partie sur l'activité des pompes à efflux de xénobiotiques. Ces pompes, très largement connues chez les vertébrés, le sont moins chez les invertébrés. L'activité MXR, supposée reposer initialement sur l'expression de protéines apparentées à la P-glycoprotéine par analogie avec le phénotype MDR chez l'Homme, a cependant été étudiée antérieurement par plusieurs équipes travaillant sur les hémocytes (Minier & Moore, 1996 ; Svensson, Särngren *et al.*, 2003 ; Marin, Legros *et al.*, 2004 ; Zaja, Klobucar *et al.*, 2006).

Au moins deux gènes orthologues à des ABC transporteurs de vertébrés ont été identifiés sur la base d'homologies dans les séquences d'acides aminés obtenues à partir de transcriptions complètes ou d'ARNm fragmentaires (Lüdeking & Köhler, 2002; Lüdeking, Van Noorden *et al.*, 2005; Luckenbach & Epel, 2008 ). L'alignement des séquences en acides aminés donne seulement 38 à 50 % d'identité entre la protéine apparentée à la P-gp chez *Mytilus* et les produits des gènes ABCB chez l'Homme. De même, l'identité de la séquence en acides aminés de la protéine apparentée aux MRPs (Multiresistance Related Proteins) chez *Mytilus* ne donne que 27 à 44% d'identité avec les produits des gènes ABCC chez l'Homme (Luckenbach & Epel, 2008). Les niveaux de transcriptions ont été quantifiés, à partir d'animaux d'origines différentes et sous différentes conditions environnementales, dans les branchies, la glande digestive, le manteau et le muscle adducteur postérieur (Lüdeking & Köhler, 2002; Lüdeking & Koehler, 2004; Lüdeking, Van Noorden *et al.*, 2005). Dans le présent travail, nous avons constaté que les deux ARNm ABCB / P-gp et ABCC / MRP sont également transcrits dans les hémocytes de *Mytilus edulis*, mais à des niveaux plus faibles que dans les branchies. Cependant, une petite quantité de protéines ABCB-like a été mise en évidence dans des lysats d'hémocytes totaux en utilisant l'anticorps monoclonal anti-P-glycoprotéine c219, alors qu'une expression massive a été détectée à partir des extraits de branchies. La localisation par immunohistochimie indirecte au c219 des protéines de transport ABCB / P-gp dans les hémocytes perméabilisés et fixés s'avère infructueuse. En revanche, un immuno-marquage apparaît dans des hémocytes étalés lors de l'utilisation d'anticorps monoclonaux conjugués à la phycoérythrine UIC2 – dirigés spécifiquement contre une boucle extracellulaire de P-glycoprotéine humaine - (Zhou, Gottesman *et al.*, 1999; Pasquier, Galas *et al.*, 2012 ). Ce marquage à l'UIC2 est clairement limité aux zones de la membrane

cellulaire qui font face à des structures vésiculaires périnucléaires tout en subissant les mouvements cytoplasmiques autonomes. Cette coloration confinée pourrait être liée à des fonctions particulières de certaines familles de transporteurs ABC comme la séquestration d'allocrite, l'échange ou l'efflux, dans ou vers des organites intracellulaires tels que les granules, les peroxysomes ou les lysosomes. Cette fonction a pu être décrite entre autre dans les cellules immunitaires de divers organismes (Chapuy, Koch *et al.*, 2008 ; Morita & Imanaka, 2012 ; Shipp & Hamdoun, 2012). Ainsi, la sous famille ABCD efflue les composés liés à un acyl-CoA vers le peroxysome pour subir une  $\beta$ -oxydation (Morita & Imanaka, 2012), ou encore la ABCA3 qui confère à lui seul un phénotype MDR en séquestrant les agents cytotoxiques dans le lysosome (Chapuy, Koch *et al.*, 2008). La séquestration de composés toxiques à l'intérieur des organelles a pour effet de diminuer leurs concentrations intracytoplasmiques, mais aussi, d'éliminer ces composés, soit directement par exocytose soit grâce à l'environnement physico/chimio/protéique particulier créé dans la lumière de ces structures.

L'absence d'anticorps capables de détecter les sous familles de transporteurs ABC, et notamment ABCC, chez la moule limite clairement l'étude approfondie par immunocytologie des compartiments sous-cellulaires.

La mesure des quantités de transcrits ou la détection des acteurs moléculaires ne renseigne cependant pas sur l'activité. L'estimation de cette activité ne peut pas être mesurée ou déduite par des méthodes non fonctionnelles, telles que Northern blot, l'hybridation *in situ* d'ARN, la RT-PCR ou l'immunohistochimie. En outre, il a été démontré que les transcrits sont souvent présents en dessous du seuil de détection alors que relativement peu de molécules actives peuvent provoquer des modifications importantes dans le transport des allocrites (Lebedeva, Pande *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'activité des transporteurs ABC n'est pas toujours corrélée avec leurs niveaux d'expression (Beck, Grogan *et al.*, 1996), car le transport d'efflux fonctionnel est largement influencé par les microdomaines lipidiques membranaires (Urbatsch & Senior, 1995), l'état de phosphorylation des protéines (Stolarczyk, Reiling *et al.*, 2011) ou l'adressage intracellulaire des protéines (Fu, Bebawy *et al.*, 2004). Pour la première fois chez des mollusques bivalves, nous avons réalisé une analyse fonctionnelle du phénotype MXR en cytométrie en flux. L'efflux de la Calcein-AM, un allocrite pro-fluorescent des ABCB / P-gp et à la fois des ABCC / MRP transporteurs, est révélateur de l'activité MXR (Legrand, Simonin *et al.*, 1998). Les hémocytes de *Mytilus edulis* forment une population de cellules morphologiquement et fonctionnellement hétérogènes comme nous avons pu le montrer par ces présents travaux et par d'autres équipes

(Garcia-Garcia, Prado-Alvarez *et al.*, 2008 ; Parisi, Li *et al.*, 2008). L'histogramme de distribution des fluorescences semble être largement dispersé sur trois décades et affiche deux pics, correspondant à une faible et à une forte quantité de calcéine intracellulaire. Ces deux concentrations modales révèlent une variation importante de l'accumulation de calcéine dans les cellules. L'utilisation du volume Coulter pour compenser les niveaux de fluorescence (FL1) en fonction de la taille des cellules et accéder à une concentration de fluorescence (FL1-FC) permet des comparaisons objectives des activités d'efflux entre des populations cellulaires hétérogènes. Dans ces conditions, le niveau basal de concentration de fluorescence FL1-FC, dans l'échantillon total d'hémocytes et en l'absence de bloqueurs ABC, est uniformément réparti. Cela signifie que les activités d'efflux basales sont équivalentes dans les différents sous-types hémocytes.

L'utilisation de bloqueurs spécifiques permet de rendre compte de la contribution relative de chaque famille de transporteur dans l'efflux des xénobiotiques. Aucun des trois bloqueurs spécifiques des transporteurs ABCB testés (vérapamil, zosuquidar et PSC833) n'a fait varier le niveau de fluorescence comparativement aux cellules non traitées. Alors que le MK571 amène au doublement de l'accumulation de calcéine, démontrant le rôle exclusif des ABCC/ MRP transporteurs dans les hémocytes. Ces données sont cohérentes avec les études précédentes indiquant que l'activité ABCB / P-gp est absente, et non inducible (Svensson, Särngren *et al.*, 2003) ou très faiblement dans la moule bleue (Marin, Legros *et al.*, 2004) et comme chez la moule d'eau douce *Unio pictorum* (Zaja, Klobucar *et al.*, 2006). Svensson *et al.*, en 2003, montre que ni la staurosporine, ni le vérapamil bloque l'efflux chez les hémocytes de *M. edulis*. Leurs résultats indiquent fortement que les hémocytes n'utilisent pas une activité P-gp « classique ». L'immunocytochimie conforte ces résultats, en révélant que transporteur ABCB / P-gp ne présente pas une localisation conventionnelle à la membrane plasmique, en dépit de l'expression des ARNm. Nos conclusions sont clairement différentes des résultats de travaux antérieurs qui montraient un effet des bloqueurs P-gp sur l'accumulation de rhodamine B dans les hémocytes *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* (Minier & Moore, 1996; Minier & Moore, 1998). Nos résultats indiquent aussi que le profil d'activité des transporteurs ABC dans les hémocytes de la moule bleue diffère de celui des branchies de *Mytilus californianus* (Luckenbach & Epel, 2008) où les deux types de transporteurs ABCB et ABCC contribuent au phénotype MXR.

## **B. Effets de la contamination chimique de l'environnement et capacité d'efflux des différents hémocytes**

La comparaison des activités d'efflux des deux sites de prélèvement montrent une activité basale plus faible dans les échantillons collectés à Yport comparativement à ceux prélevés au Havre où une contamination chimique des animaux aux HAP et aux PCB est mesurée (Marin, 2005 ; Aquaculture, 2011). Ce résultat peut s'expliquer par une induction des transporteurs d'efflux par les substances toxiques présentes dans les zones contaminées. Une telle induction, envisagée au sens large pour le système MXR, a déjà été mise en évidence au niveau des transcrits, des protéines ou des activités d'efflux de bivalves marins et dulçaquicoles (Minier & Moore, 1996; Minier & Moore, 1998 ; Marin, Legros *et al.*, 2004 ; Luckenbach & Epel, 2005 ; Pain & Parant, 2007 ; Navarro, Weißbach *et al.*, 2012). Matthieu Marin montre que l'activité MXR, mesurée en lecteur de plaque par l'efflux de calcéine rapporté à une DO MTT, augmente avec la température après 72h mais pas à 24h. Bien que la vitesse de réaction enzymatique pour les températures non dénaturantes s'accroisse avec la température, en respectant là encore la loi d'Arrhénius, l'effet observé ici, tardif, est probablement dû à des régulations transcriptionnelles ou post-transcriptionnelles de l'expression ou de l'activité des ABC- transporteurs. Comme décrit plus longuement dans l'introduction, de nombreux facteurs sont capables d'induire des acteurs moléculaires MXR, c'est le cas pour la température, via les HSP 70, ou des composés xénobiotiques, via les récepteurs SXR/PXR. Les travaux du même auteur en conditions tidales et intertidales montrent qu'à 12°C, les hémocytes issus de moules intertidales (comme Yport) ont une fluorescence basale CAM/MTT plus faible que les hémocytes issus des moules subtidales (comme Le Havre) après 72h de culture. La méthode utilisée par l'auteur repose sur une standardisation des quantités d'hémocytes par un test MTT, ce qui constitue assurément une importante source dans le cas des cellules immunitaires. En effet, comme nous l'avons montré précédemment (ARTICLE 4) et comme cela a été publié pour les neutrophiles humains (Oez, Platzer *et al.*, 1990; Oez, Welte *et al.*, 1990 ; Kataranovski, Kataranovski *et al.*, 1998), le test MTT est sensible à l'activité métabolique des mitochondries, elle-même variable en fonction de l'état d'activation des immunocytes. De plus, le milieu de culture à base de L-15 additionné d'amphotéricine utilisé par les auteurs ne semble pas adapté à la culture des hémocytes. Nous avons pu observer que les hémocytes de *Mytilus edulis* cultivés dans un milieu à base de L-15 se détachaient du substrat. (Quinn, Costello *et al.*, 2009) lors de la mise au point des cultures cellulaires de différents tissus chez *Dreissena polymorpha* conclut que le L-15 doit être utilisé

à 15%. De surcroît, l'amphotéricine B se révèle toxique pour les cultures cellulaires d'invertébrés (Goldstein, Fisher *et al.*, 1977) dont *Mytilus galloprovincialis* (Cao, Mercado *et al.*, 2003).

Notre méthode basée sur la cytométrie en flux permet de s'affranchir du test MTT et de ce fait de l'état d'activation des cellules en analysant chaque cellule individuellement. L'analyse des histogrammes révèle que le MK571 décale le niveau de fluorescence vers des valeurs supérieures pour la plupart des cellules issues de moules du port du Havre. Cependant, 27 % des cellules restent moins sensibles au bloqueur ABCC. Ce constat nous a conduit à effectuer une séparation analytique des activités d'efflux en fonction des types d'hémocytes.

L'étude différentielle de l'activité MXR au sein des différentes populations identifiées selon les critères EV/SS indique que les granulocytes éosinophiles des moules collectées dans des moulières contaminées aux PCBs et HAPs ont une activité basale d'efflux significativement supérieure à celle des autres types cellulaires. La réponse pharmacologique au bloqueur a été étudiée en construisant des courbes dose-réponse au MK571. Dans ces conditions, l'efficacité du blocage à la plus forte concentration utilisée (MK571 30  $\mu$ M) ne diffère pas entre les trois types cellulaires différenciellement analysés (basophiles, hyalinocytes et granulocytes éosinophiles) issus du site le moins contaminé (Yport) et est également du même ordre de grandeur pour les basophiles et les hyalinocytes prélevés sur les animaux du site le plus contaminé (Le Havre), correspondant à un facteur d'accumulation de fluorescence de x2,8 et un MAF (MXR Activity Factor) d'environ 62. En revanche, les granulocytes éosinophiles répondent avec une efficacité augmentée au MK571 30  $\mu$ M avec un effet maximal conduisant à une accumulation x5,24 de fluorescence par rapport au niveau contrôle et un MAF de 72. Dans ces expériences, la puissance du bloqueur, déterminée par concentration demi-efficace, est de l'ordre du  $\mu$ M (de 0,7 à 7  $\mu$ M) ce qui est cohérent avec une action spécifique sur un transporteur ABCC puisque une valeur de 3,5  $\mu$ M est rapportée pour des érythrocytes humains (Lania-Pietrzak, Michalak *et al.*, 2005).

Il apparaît donc que l'activité d'efflux conférant le phénotype MXR repose sur l'activité d'une protéine de type MRP dans les hémocytes et qu'elle est principalement portée par les granulocytes éosinophiles. Cette activité ABCC / MRP semble être inductible par des xénobiotiques environnementaux. Nos résultats expliquent certainement en grande partie les niveaux faibles d'activité MXR hémocytaires précédemment relevés chez la moule (Minier & Moore, 1996; Svensson, Särngren *et al.*, 2003; Luedeking & Koehler, 2004; Marin, Legros *et al.*, 2004), dans des travaux utilisant des approches sensiblement différentes, à savoir *i/* des

mesures ponctuelles en microscopie confocale ou, au contraire, globales en lecteur de plaque au lieu d'analyses restreintes aux populations d'éosinophiles par cytométrie en flux, *ii/* l'utilisation de la sonde rhodamine B au lieu de la calcéine-AM, et *iii/* la comparaison de valeurs contrôle à des niveaux bloqués par des inhibiteurs ABCB (typiquement le vérapamil) au lieu d'inhibiteurs ABCC.

Pour une utilisation comme biomarqueur d'exposition, l'évaluation du phénotype MXR à partir de l'activité d'efflux de la calcéine-AM mesurée en cytométrie en flux sur le paramètre FL-FC associée au calcul du MAF en présence de 30  $\mu$ M de MK571 et en restreignant l'analyse aux granulocytes éosinophiles constitue certainement une optimisation intéressante. Cette approche doit maintenant être validée par une campagne d'évaluation extensive sur le terrain.

#### ***IV. MXR et motilité (ARTICLE 4)***

Parmi tous les acteurs et régulateurs de la motilité, dont une grande partie est revue par (Ridley, 2011) et (Vorotnikov, 2011), certains interviennent dans des voies de signalisation faisant l'objet de peu d'études. C'est le cas des protéines d'efflux conférant le phénotype de résistance multiple aux médicaments (MDR). Ainsi (Randolph, Beaulieu *et al.*, 1998) montre que le blocage de la P-glycoprotéine par un anticorps inhibe aussi la migration des lymphocytes T et des cellules dendritiques sur des explants de peau humaine cultivés. De même, l'inhibition de MRP1 par l'antagoniste MK571 (Robbiani, Finch *et al.*, 2000) ou de MRP4 par le citrate de sildénafil (Viagra) ou par ARN interférence (van de Ven, Scheffer *et al.*, 2008) inhibe la migration des cellules dendritiques humaines vers les ganglions lymphatiques.

Sachant que les hémocytes de *Mytilus edulis* expriment des protéines ABCB et ABCC, que ces cellules migrent et que nous disposons d'un système de mesure de la motilité cellulaire, nous avons été conduit à tester les inhibiteurs des transporteurs ABC sur la migration des hémocytes (ARTICLE 4). Dans les conditions de tracking habituelles, à 14°C et dans du MPSS, l'exposition durant une heure à 30  $\mu$ M de l'inhibiteur ABCC MK571 provoque une chute de la vitesse de migration d'un facteur supérieur à deux, pour les hémocytes prélevés sur des moules originaires d'Yport ou du Havre, en vitesse initiale à t=0h et après 48 heures de culture. Les bloqueurs non compétitifs des protéines ABCB, le PSC833 et pour la première fois dans cette thèse le tripeptide reversine 205, sont sans effet sur la motilité

hémo-cytaire. Ainsi, les bloqueurs MRP ont une action chimiokinétique négative sur les hémo-cytes de moule, tout comme sur les cellules dendritiques humaines. Cette fonction semble avoir été également retenue dans les systèmes immunitaires innés des deux espèces. Des expériences complémentaires doivent cependant être menées pour vérifier que l'effet du MK571 n'est pas de nature toxique ou chimiosensibilisante vis-à-vis du Hoechst 33342, lui-même allocrite MRP interagissant avec l'ADN mais faiblement efflué en condition contrôle dans la mesure où cette sonde marque efficacement le noyau.

Bien que les mécanismes impliquant ces pompes d'efflux dans la migration des immunocytes ne soient pas encore bien compris, il est indubitable que les transporteurs ABC jouent un rôle dans l'immunité. Au cours des 15 dernières années, il est apparu que plusieurs transporteurs ABC sont non seulement impliqués dans le transport d'agents cytotoxiques mais aussi dans celui des médiateurs inflammatoires tels que le facteur d'activation plaquettaire, les leucotriènes ou les prostaglandines (van de Ven, Scheffer *et al.*, 2008). D'autres liens entre les transporteurs de la résistance multiple et la régulation immunitaire des lymphocytes T ont été signalés, mais aucun ne révèle un mécanisme clair de leurs activités. Ainsi la protéine MRP1 est constitutivement exprimée par les lymphocytes T auxiliaires de type 2 et est induite sur les cellules de type 1 après stimulation antigénique (Lohoff, Prechtel *et al.*, 1998). Le blocage des transporteurs affecte de façon différentielle la sécrétion de cytokines. L'inhibition de la P-glycoprotéine inhibe, *in vitro*, la sécrétion de l'IL-2, IL-4 et IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T, mais n'affecte pas les niveaux d'IL-6 (Drach, Gsur *et al.*, 1996). D'autre part, le blocage du transport médié par MRP1 améliore la sécrétion d'IL-6 (Vellenga, Tuyt *et al.*, 1999). Ces transporteurs ABC sont responsables du transport des facteurs paracrines génériques, tels que les prostaglandines, mais aussi de chimiokines comme les leucotriènes ou plus spécifiquement CCL19 et CCL21, toutes deux impliquées dans la migration des cellules dendritiques (van de Ven, Scheffer *et al.*, 2008).

Les transporteurs ABC de type C sont connus pour effluer les composés conjugués aux GSH-, aux glucuronates ou aux anions sulfates et, par conséquent, être impliqués dans la résistance aux toxiques (Leslie, Deeley *et al.*, 2005; Choudhuri & Klaassen, 2006). La détoxification de l'organisme par efflux est une fonction biologique fondamentale des barrières de perméabilité ou des organes d'excrétions présentant des feuilletts cellulaires à jonctions étanches. Ces structures, comme la barrière hémato-encéphalique et le foie chez les vertébrés (Deeley, Westlake *et al.*, 2006) ou les branchies chez la moule (Luckenbach & Epel, 2008), expriment plusieurs classes d'ABC transporteurs adressés spécifiquement à la membrane baso-latérale ou à la membrane apicale. L'activité d'efflux se fait selon un courant

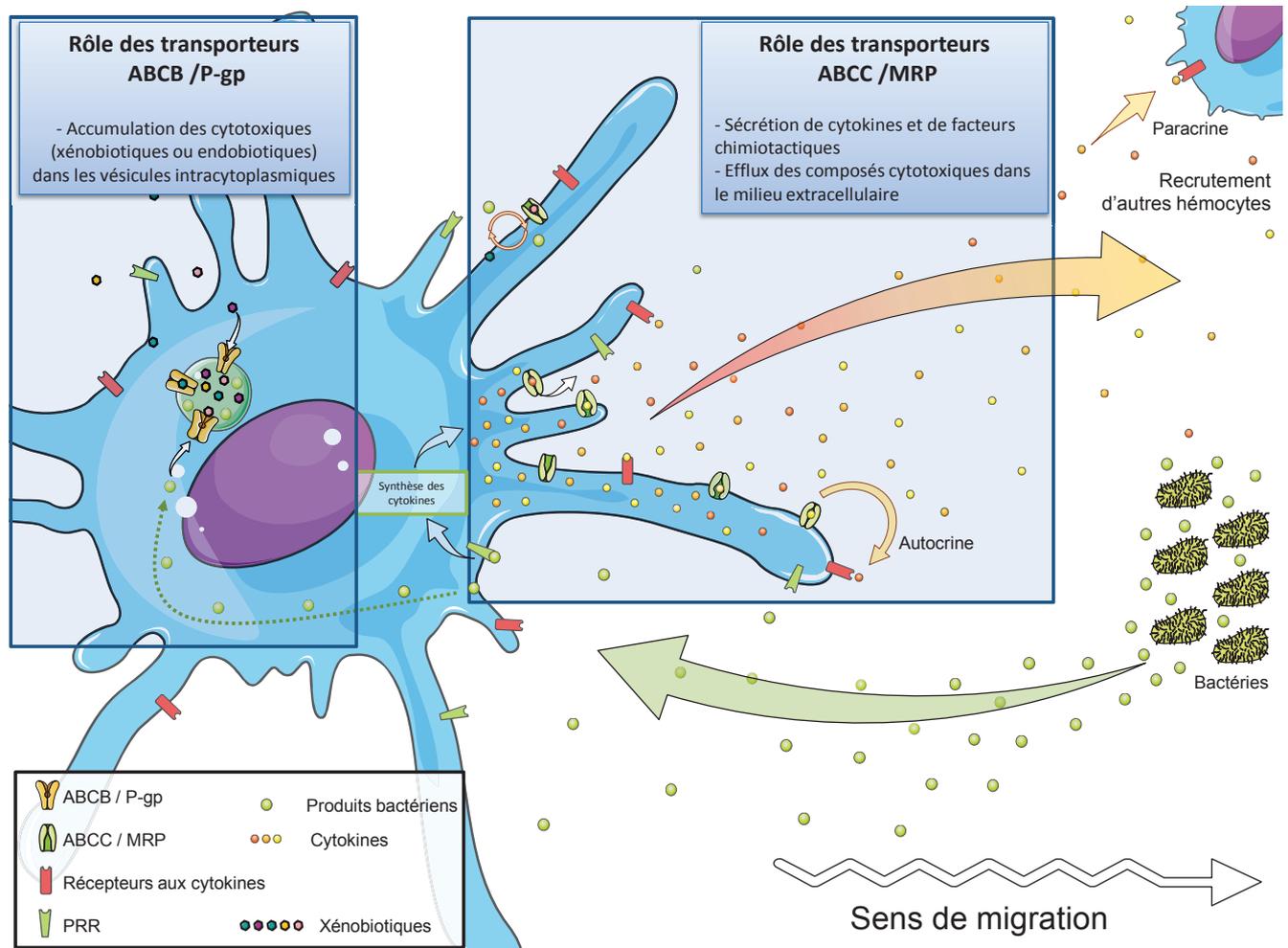
unidirectionnel, drainant les toxiques vers le compartiment excréteur ou une lumière débouchant vers l'extérieur. A l'inverse, pour des cellules dispersées dans le sang et les tissus comme les immunocytes, les pompes à efflux s'avèrent beaucoup moins efficaces car les allocrites baignent les cellules et sont refoulés dans le compartiment extracellulaire selon une boucle courte diffusion-pompage-diffusion. L'activité d'efflux doit donc dans ce cas être vue comme un mécanisme d'autoprotection cellulaire, abaissant seulement la concentration cytosolique en toxiques sans conduire à une réelle détoxification.

Des fonctions biologiques alternatives des transporteurs ABC dans ces cellules sont donc discutées depuis plusieurs années (Johnstone, Ruefli *et al.*, 2000 ; Mizutani, Masuda *et al.*, 2008). L'expression constitutive relativement élevée de la P-gp dans les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques est intrigante, et des efforts ont été faits pour établir une corrélation entre cette observation avec un rôle dans le fonctionnement des cellules effectrices. Ces cellules sont capables d'induire la mort par le système Fas/Fas ligand et la libération de granules cytotoxiques comprenant par exemple des perforines et des granzymes dans la cellule cible (Smyth & Trapani, 1995). Un certain nombre de chercheurs ont montré que l'inhibition de la fonction d'efflux P-gp dépendante aboutissait à une réduction de l'activité cytolytique (Gupta, Kim *et al.*, 1992; Chong, Markham *et al.*, 1993 ). Cependant, aucune voie n'a pu être mise en évidence jusqu'à ce jour, il est possible que la P-gp fonctionnelle soit nécessaire pour une liaison optimale à la cellule cible ou à l'induction du processus cytolytique, ou les deux (Johnstone, Ruefli *et al.*, 2000). Il est également possible que la P-gp serve à protéger les cellules immunitaires de la lyse directe ou subie dans l'environnement hostile d'une réponse immunitaire. Bien que la P-gp ne protège pas de la lyse cellulaire causée par les perforines Weisburg *et al.* ont montré que la P-gp peut conférer une résistance à la lyse cellulaire induite par le complément activé (Weisburg, Curcio *et al.*, 1996; Weisburg, Roepe *et al.*, 1999).

Pris dans leur ensemble, nos résultats et la littérature actuelle permettent d'envisager la fonction centrale des transporteurs ABCC dans la migration cellulaire comme peut le résumer la **Figure 39**.

L'activité d'efflux médiée par les transporteurs ABCC/MRP des granulocytes éosinophiles chez la moule est induite en condition d'exposition aux contaminants environnementaux. D'autre part, cette activité est sensible aux chimiosensibilisants comme le MK571, qui bloquent la migration cellulaire et pourraient, en conséquence, exercer un effet dépresseur sur l'immunité. Ainsi, certains allocrites MRP présents dans l'environnement pourraient par leur action compétitive vis-à-vis de facteurs chimiokinétiques endogènes, avoir

une action délétère sur la défense immunitaire. Parallèlement au rôle qui leur est conféré dans le phénotype MXR des tissus barrières, les transporteurs d'efflux pourraient constituer des biomarqueurs intéressants pour évaluer les atteintes immunotoxiques dans le cadre de la régulation de la motilité hémocytaire.



**Figure 39. Rôle des transporteurs ABC dans les hémocytes de *Mytilus edulis*.**

Dans cette représentation, seuls les transporteurs ABCC/MRP sont impliqués dans la sécrétion de cytokines et, par conséquent, dans la régulation de la migration des hémocytes. Les transporteurs ABCB/P-gp séquestrent les composés cytotoxiques dans les vésicules. Noter la présence de boucles autocrines et paracrines.

Au-delà de l'intérêt de ces questions sur le plan de la physiologie comparée de l'immunité et des éventuelles applications dans le domaine de l'écotoxicologie, le modèle des hémocytes de *Mytilus edulis* et de leur activité migratoire présente un intérêt certain en biologie fondamentale, dans le contexte simplifié d'une immunité exclusivement innée.

# ***CONCLUSION & PERSPECTIVES***

---

Dans l'ensemble, nos résultats proposent une vision dynamique et morphofonctionnelle des effecteurs cellulaires de l'immunité exclusivement innée chez *Mytilus edulis*, sur la base types cellulaires identifiés dans la littérature scientifique : les granulocytes éosinophiles, les hyalinocytes et les basophiles. Cette classification, encore fragile en l'absence de marqueurs moléculaires, d'organe hémopoïétique identifié, de connaissances sur le cycle de vie, les étapes de maturation et d'activation des hémocytes doit être enrichie par des travaux précisant les rôles physiologiques des différents types cellulaires. L'étude des mouvements hémocytaires au niveau de la cellule unique permet de proposer de nouveaux critères aidant à discerner les différentes sous-populations. La capacité de ces cellules à modifier rapidement leur morphologie, même à 12°C, impose d'exclure toute identification cytologique fondée simplement sur la morphologie dans des préparations de cellules vivantes ou fixées. Comme l'ont indiqué GarciaGarcia *et al.* en 2008, un effort urgent doit être fait pour proposer des critères consensuels de classification des hémocytes de moule. Les mouvements cellulaires révélés par nos travaux montrent des interactions qui restent à élucider entre les hémocytes de sous-populations différentes. Ainsi, les agrégats, avec leurs cœurs de basophiles, ainsi que la présence quasi systématique des basophiles sur les autres cellules montrent le possible rôle prévalent de ce type cellulaire dans la réponse immunitaire.

Notre analyse de la migration des hémocytes suggère fortement que la motilité est très sensible aux microenvironnements cellulaires. Nous avons pu montrer l'effet de la température et du milieu de culture et observer des divergences selon les sites de prélèvement. A l'instar de la phagocytose, la motilité cellulaire constitue un indicateur intégré pour l'évaluation de l'immunotoxicité dans le cadre d'expositions *in vitro* ou *in vivo* d'hémocytes ou d'organismes entiers. Un certain nombre de validations doivent encore être réalisées avant de pouvoir prétendre à la proposer comme éventuel biomarqueur fiable. La méthode de tracking cellulaire mise au point dans ce travail pourra être utilisée pour caractériser la motilité des hémocytes en réponse aux variations saisonnières, aux changements climatiques, ainsi qu'aux challenges bactériens et aussi aux contaminants aquatiques. L'altération de la vitesse de migration d'une lignée cellulaire de macrophages humains mobiles a déjà été utilisée pour

évaluer la toxicité des polluants atmosphériques (Laval-Gilly, Falla *et al.*, 2000). De la même façon, les modifications potentielles de la motilité des hémocytes de moules pourraient constituer un outil précieux pour l'écotoxicologie marine.

L'utilisation, pour la première fois, de la cytométrie en flux pour caractériser le phénotype MXR a révélé deux points majeurs: l'activité d'efflux est uniquement médiée par les transporteurs ABCC/MRP et elle est principalement portée par les granulocytes éosinophiles. Cette activité semble inductible dans cette sous-population tandis qu'elle présente un niveau basal dans les hyalinocytes et les basophiles. La P-gp, quant à elle, s'avère être localisée dans des vésicules, sans qu'une activité mesurable permette d'affirmer qu'elle contribue à un efflux de détoxification. Dans ce travail, les transporteurs ABC apparaissent aussi comme des protéines multifacettes impliquées à la fois dans le drainage des cytotoxiques du cytosol et dans des processus physiologiques fondamentaux distincts de leur activité d'efflux. Les transporteurs ABCC/MRP hémocytaires semblent plus liés au contrôle chimiokinétique de la migration cellulaire, qu'à une réelle "résistance" contre les xénotoxiques, qui n'a jamais été directement démontrée sur des modèles cellulaires de bivalves. Il est finalement assez probable que la détoxification ne soit pas le rôle principal des transporteurs ABC dans les immunocytes.

Une meilleure compréhension de la motilité hémocytaire pourrait fournir de précieuses informations concernant le rôle des ABC transporteurs dans cette fonction. L'étude de la motilité *in vivo* apporterait également des éléments physiologiques fondamentaux sur certaines fonctions des hémocytes comme la réparation tissulaire ou l'infiltration des tissus. L'isolement de l'organe hématopœtique permettrait d'établir une classification plus précise des hémocytes avec compréhension de l'hématopœse. L'activation des cellules au prélèvement n'est pas bien comprise. L'existence de répresseurs de l'inflammation solubles dans l'hémolymphe et/ou de récepteurs (comme des mécanorécepteurs par exemple) à la surface des hémocytes induisant une activation restent à démontrer. Ces travaux pourraient constituer une base de travail pour le développement d'un biotest permettant d'évaluer la qualité de l'eau marine en se fondant sur la motilité des hémocytes de moule.

# BIBLIOGRAPHIE

---

- Abadie, V., E. Badell, P. Douillard, D. Ensergueix, P. J. M. Leenen, M. Tanguy, L. Fiette, S. Saeland, B. Gicquel and N. Winter (2005). "Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes." Blood **106**(5): 1843-1850.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-03-1281>.
- Acosta-Salmón, H. and P. C. Southgate (2006). "Wound healing after excision of mantle tissue from the Akoya pearl oyster, *Pinctada fucata*." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **143**(2): 264-268.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.12.006>.
- Adema, C. M., L. A. Hertel and E. S. Loker (1999). "Evidence from two planorbid snails of a complex and dedicated response to digenean (echinostome) infection." Parasitology **119** ( Pt 4): 395-404.  
url: [http://journals.cambridge.org/article\\_S0031182099004850](http://journals.cambridge.org/article_S0031182099004850).
- Adema, C. M., L. A. Hertel, R. D. Miller and E. S. Loker (1997). "A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(16): 8691-8696.  
url: <http://www.pnas.org/content/94/16/8691.abstract>.
- Aderem, A. and R. J. Ulevitch (2000). "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response." Nature **406**(6797): 782-787.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/35021228>.
- Affolter, M. and C. J. Weijer (2005). "Signaling to Cytoskeletal Dynamics during Chemotaxis." Developmental Cell **9**(1): 19-34.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2005.06.003>.
- Agrawal, A., Q. M. Eastman and D. G. Schatz (1998). "Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system." Nature **394**(6695): 744-751.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/29457>.
- Akaishi, F. M., S. D. St-Jean, F. Bishay, J. Clarke, S. R. I. da and C. A. de Oliveira Ribeiro (2007). "Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater." Aquatic Toxicology **82**(1): 1-14.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.01.008>.
- Akimaru, K., M. T. Kuo, K. Furuta, M. Suzuki, R. Noyori and T. Ishikawa (1996). "Induction of MRP/GS-X pump and cellular resistance to anticancer prostaglandins." Cytotechnology **19**(3): 221-227.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00744216>.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nature Review Immunology **4**(7): 499-511.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nri1391>.
- Ambudkar, S. V., C. Kimchi-Sarfaty, Z. E. Sauna and M. M. Gottesman (2003). "P-glycoprotein: from genomics to mechanism." Oncogene **22**(47): 7468-7485.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1206948>.
- Aquaculture, I. (2011). "Surveillance ROCCH."  
from <http://www.ifremer.fr/lerlr/surveillance/rocch.htm>.
- Aquaculture, I. (2012). "Production de Mytilidés."  
from <http://aquaculture.ifremer.fr/Statistiques-mondiales/Stats-conchyliculture/Production-par-famille/Mytilides>.
- Arason, G. J. (1996). "Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates." Fish & Shellfish Immunology **6**(4): 277-289.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/fsim.1996.0029>.
- Armstrong, P. B., Quigley and J. P. (1992). Humoral immunity : alpha[2]-macroglobulin activity in the plasma of mollusks. Santa Barbara, CA, ETATS-UNIS, California Malacozoological Society.

- Armstrong, P. (2010). "Role of  $\alpha$ 2-macroglobulin in the immune response of invertebrates." Invertebrate Survival Journal **7**: 165-180.  
url: [www.isj.unimo.it/articoli/ISJ215.pdf](http://www.isj.unimo.it/articoli/ISJ215.pdf).
- Armstrong, P. B. (2006). "Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host–pathogen interaction." Immunobiology **211**(4): 263-281.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2006.01.002>.
- Arumugam, M., B. Romestand, J. Torreilles and P. Roch (2000). "In vitro production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis." European Journal of Cell Biology **79**(7): 513-519.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1078/0171-9335-00068>.
- Asokan, R., M. Arumugam and P. Mullainadhan (1997). "Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus." Developmental & Comparative Immunology **21**(1): 1-12.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X\(97\)00004-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X(97)00004-9).
- Auffret, M. and R. Oubella (1997). "Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: In vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology **118**(3): 705-712.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9629\(97\)00017-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-9629(97)00017-0).
- Auffret, M., S. Rousseau, I. Boutet, A. Tanguy, J. Baron, D. Moraga and M. Duchemin (2006). "A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean." Ecotoxicology and Environmental Safety **63**(3): 393-405.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.10.016>.
- Azumi, K., R. Santis, A. Tomaso, I. Rigoutsos, F. Yoshizaki, M. Pinto, R. Marino, K. Shida, M. Ikeda, M. Ikeda, M. Arai, Y. Inoue, T. Shimizu, N. Satoh, D. Rokhsar, L. Pasquier, M. Kasahara, M. Satake and M. Nonaka (2003). "Genomic analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: "waiting for Godot"." Immunogenetics **55**(8): 570-581.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00251-003-0606-5>.
- Babarro, J. M. F. and A. de Zwaan (2002). "Influence of abiotic factors on bacterial proliferation and anoxic survival of the sea mussel *Mytilus edulis* L." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **273**(1): 33-49.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981\(02\)00139-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00139-9).
- Balaban, R. S., S. Nemoto and T. Finkel (2005). "Mitochondria, Oxidants, and Aging." Cell **120**(4): 483-495.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.001>.
- Bandow, K., J. Kusuyama, M. Shamoto, K. Kakimoto, T. Ohnishi and T. Matsuguchi (2012). "LPS-induced chemokine expression in both MyD88-dependent and -independent manners is regulated by Cot/Tpl2-ERK axis in macrophages." FEBS Letters **586**(10): 1540-1546.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.04.018>.
- Bard, S. M. (2000). "Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms." Aquatic Toxicology **48**(4): 357-389.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00088-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00088-6).
- Barillas-Mury, C., B. Wizel and Y. Soo Han (2000). "Mosquito immune responses and malaria transmission: lessons from insect model systems and implications for vertebrate innate immunity and vaccine development." Insect Biochemistry and Molecular Biology **30**(6): 429-442.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00018-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00018-7).
- Baumard, P., H. Budzinski, P. Garrigues, J. F. Narbonne, T. Burgeot, X. Michel and J. Bellocq (1999). "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp.) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability." Marine Environmental Research **47**(5): 415-439.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(98\)00128-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(98)00128-7).
- Bayne, B. L. (1976). Marine mussels : their ecology and physiology / edited by B. L. Bayne, Cambridge : Cambridge University Press.
- Beck, W. T., T. M. Grogan, C. L. Willman, C. Cordon-Cardo, D. M. Parham, J. F. Kuttesch, M. Andreeff, S. E. Bates, C. W. Berard, J. M. Boyett, N. A. Brophy, H. J. Broxterman, H. S. L. Chan, W. S. Dalton, M. Dietel, A. T. Fojo, R. D. Gascoyne, D. Head, P. J. Houghton, D. K. Srivastava, M. Lehnert, C. P. Leith, E. Paietta, Z. P. Pavelic, L. Rimsza, I. B. Roninson, B. I. Sikic, P. R. Twentyman, R. Warnke and R.

- Weinstein (1996). "Methods to Detect P-Glycoprotein-associated Multidrug Resistance in Patients' Tumors: Consensus Recommendations." Cancer Res **56**(13): 3010-3020.  
url: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/56/13/3010.abstract>.
- Bégué, P., M. Girard, H. Bazin and J.-F. Bach (2012). Les adjuvants vaccinaux: quelle actualité en 2012 ? Paris, Académie Nationale de Médecine.  
url.
- Beninger, P. G., G. Le Penneec and M. Le Penneec (2003). "Demonstration of nutrient pathway from the digestive system to oocytes in the gonad intestinal loop of the scallop *Pecten maximus* L." The Biological Bulletin **205**(1): 83-92.  
url: <http://www.biobull.org/content/205/1/83.long>.
- Bernstein, R. M., S. F. Schluter, H. Bernstein and J. J. Marchalonis (1996). "Primordial emergence of the recombination activating gene 1 (RAG1): sequence of the complete shark gene indicates homology to microbial integrases." Proceedings of the National Academy of Sciences **93**(18): 9454-9459.  
url: <http://www.pnas.org/content/93/18/9454.abstract>.
- Berny, P., O. Lachaux, T. Buronfosse, M. Mazallon and C. Gillet (2002). "Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as indicators of freshwater contamination with lindane." Environmental Research **90**(2): 142-151.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/enrs.2002.4371>.
- Bertrand, F. (2010). **Thèse**: Polarisation à la synapse immunologique de la machinerie sécrétoire des lymphocytes T mécanismes moléculaires et impact sur la cellule présentatrice d'antigène, Université Paul Sabatier.
- Bettencourt, R., P. Dando, P. Collins, V. Costa, B. Allam and R. Serrão Santos (2009). "Innate immunity in the deep sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **152**(2): 278-289.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.10.022>.
- Bettencourt, R., P. Dando, D. Rosa, V. Riou, A. Colaço, J. Sarrazin, P.-M. Sarradin and R. S. Santos (2008). "Changes of gill and hemocyte-related bio-indicators during long term maintenance of the vent mussel *Bathymodiolus azoricus* held in aquaria at atmospheric pressure." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **150**(1): 1-7.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.02.020>.
- Betti, M., C. Ciacci, L. C. Lorusso, B. Canonico, T. Falcioni, G. Gallo and L. Canesi (2006). "Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on *Mytilus* haemocytes: role of stress-activated mitogen-activated protein kinases (MAPKs)." Biology of the Cell **98**(4): 233-244.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1042/BC20050049>.
- Biedler, J. L. and H. Riehm (1970). "Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies." Cancer Res **30**(4): 1174-1184.  
url: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/30/4/1174.long>.
- Blanchette, C. D., Y.-H. Woo, C. Thomas, N. Shen, T. A. Sulchek and A. L. Hiddessen (2009). "Decoupling internalization, acidification and phagosomal-endosomal/lysosomal fusion during phagocytosis of InLA coated beads in epithelial cells." PLoS ONE **4**(6): e6056.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006056>.
- Blight, M. A. and I. B. Holland (1990). "Structure and function of haemolysin B, P-glycoprotein and other members of a novel family of membrane translocators." Molecular Microbiology **4**(6): 873-880.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00660.x>.
- Bohlsón, S. S., D. A. Fraser and A. J. Tenner (2007). "Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions." Mol Immunol **44**(1-3): 33-43.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2006.06.021>.
- Borst, P., R. Evers, M. Kool and J. Wijnholds (2000). "A Family of Drug Transporters: the Multidrug Resistance-Associated Proteins." Journal of the National Cancer Institute **92**(16): 1295-1302.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/92.16.1295>.
- Bosch, I. and J. Croop (1996). "P-glycoprotein multidrug resistance and cancer." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer **1288**(2): F37-F54.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0304-419X\(96\)00022-4](http://dx.doi.org/10.1016/0304-419X(96)00022-4).

- Bosgraaf, L. and P. J. M. Van Haastert (2009). "Navigation of chemotactic cells by parallel signaling to pseudopod persistence and orientation." PLoS ONE **4**(8): e6842.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006842>.
- Bouton, D., H. Escriva, R. L. de Mendonça, C. Glineur, B. Bertin, C. Noël, M. Robinson-Rechavi, A. de Groot, J. Cornette, V. Laudet and R. J. Pierce (2005). "A conserved retinoid X receptor (RXR) from the mollusk *Biomphalaria glabrata* transactivates transcription in the presence of retinoids." Journal of Molecular Endocrinology **34**(2): 567-582.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1677/jme.1.01766>.
- Bozzaro, S., C. Bucci and M. Steinert (2008). Chapter 6 Phagocytosis and Host–Pathogen Interactions in *Dictyostelium* with a Look at Macrophages. International Review of Cell and Molecular Biology. W. J. Kwang, Academic Press. **Volume 271**: 253-300.
- Bresler, V., V. Bissinger, A. Abelson, H. Dizer, A. Sturm, R. Kratke, L. Fishelson and P.-D. Hansen (1999). "Marine molluscs and fish as biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea." Helgoland Marine Research **53**(3-4): 219-243.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s101520050026>.
- Bretscher, M. S. (2008). "Exocytosis provides the membrane for protrusion, at least in migrating fibroblasts." Nature Reviews Molecular Cell Biology **9**(11): 916-916.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2419-c3>.
- Broeks, A., H. W. Janssen, J. Calafat and R. H. Plasterk (1995). "A P-glycoprotein protects *Caenorhabditis elegans* against natural toxins." European Molecular Biology Organization Journal **14**(9): 1858-1866.  
url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC398285/>.
- Brogden, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?" Nature Reviews Microbiology **3**(3): 238-250.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1098>.
- Brooks, B. W. and D. B. Huggett (2012). Human Pharmaceuticals in the Environment: Current and Future Perspectives, Springer.
- Brown, G. D. (2006). "Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor." Nature Reviews Immunology **6**(1): 33-43.  
DOI: [http://www.nature.com/nri/journal/v6/n1/supinfo/nri1745\\_S1.html](http://www.nature.com/nri/journal/v6/n1/supinfo/nri1745_S1.html).
- Buccione, R., G. Caldieri and I. Ayala (2009). "Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix." Cancer and Metastasis Reviews **28**(1-2): 137-149.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10555-008-9176-1>.
- Buggé, D. M., H. Hégarret, G. H. Wikfors and B. Allam (2007). "Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes." Fish & Shellfish Immunology **23**(1): 188-196.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2006.10.006>.
- Bulgheresi, S., I. Schabussova, T. Chen, N. P. Mullin, R. M. Maizels and J. A. Ott (2006). "A new C-type lectin similar to the human immunoreceptor DC-SIGN mediates symbiont acquisition by a marine nematode." Appl Environ Microbiol **72**(4): 2950-2956.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.4.2950-2956.2006>.
- Burnet, F. M. (1976). "A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection." CA Cancer J Clin **26**(2): 119-121.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3322/canjclin.26.2.119>.
- Buttemer, W. A., D. Abele and D. Costantini (2010). "From bivalves to birds: oxidative stress and longevity." Functional Ecology **24**(5): 971-983.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01740.x>.
- Cadavid, L. F. (2004). "Self-discrimination in colonial invertebrates: genetic control of allorecognition in the hydroid *Hydractinia*." Developmental and comparative immunology **28**(9): 871-879.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2004.01.007>.
- Cajaraville, M. P., I. Olabarrieta and I. Marigomez (1996). "In vitro activities in mussel hemocytes as biomarkers of environmental quality: a case study in the Abra Estuary (Biscay Bay)." Ecotoxicology and Environmental Safety **35**(3): 253-260.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/eesa.1996.0108>.

- Cajaraville, M. P. and S. G. Pal (1995). "Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment." Cell Structure and Function **20**(5): 355-367.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1247/csf.20.355>.
- Callaghan, R., E. Crowley, M. Biochem, S. Potter and I. D. Kerr (2008). "P-glycoprotein: So Many Ways to Turn It On." The Journal of Clinical Pharmacology **48**(3): 365-378.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0091270007311568>.
- Callewaert, L. and C. W. Michiels (2010). "Lysozymes in the animal kingdom." J Biosci **35**(1): 127-160.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12038-010-0015-5>.
- Canesi, L., M. Betti, C. Ciacci, A. Scarpato, B. Citterio, C. Pruzzo and G. Gallo (2002). "Signaling pathways involved in the physiological response of mussel hemocytes to bacterial challenge: the role of stress-activated p38 MAP kinases." Developmental and comparative immunology **26**(4): 325-334.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00078-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00078-7).
- Canesi, L., C. Ciacci, M. Betti, R. Fabbri, B. Canonico, A. Fantinati, A. Marcomini and G. Pojana (2008). "Immunotoxicity of carbon black nanoparticles to blue mussel hemocytes." Environment International **34**(8): 1114-1119.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2008.04.002>.
- Canesi, L., C. Ciacci, M. Betti, A. Scarpato, B. Citterio, C. Pruzzo and G. Gallo (2003). "Effects of PCB congeners on the immune function of *Mytilus* hemocytes: alterations of tyrosine kinase-mediated cell signaling." Aquatic Toxicology **63**(3): 293-306.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00186-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00186-8).
- Canesi, L., C. Ciacci, R. Fabbri, A. Marcomini, G. Pojana and G. Gallo (2012). "Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity." Marine Environmental Research **76**(0): 16-21.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.06.005>.
- Canesi, L., C. Ciacci, L. C. Lorusso, M. Betti, G. Gallo, G. Pojana and A. Marcomini (2007). "Effects of Triclosan on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte function and digestive gland enzyme activities: possible modes of action on non target organisms." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **145**(3): 464-472.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.02.002>.
- Canesi, L., C. Ciacci, L. C. Lorusso, M. Betti, T. Guarnieri, S. Tavolari and G. Gallo (2006). "Immunomodulation by 17beta-estradiol in bivalve hemocytes." American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **291**(3): R664-673.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00139.2006>.
- Canesi, L., C. Ciacci, D. Vallotto, G. Gallo, A. Marcomini and G. Pojana (2010). "In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>) on *Mytilus hemocytes*." Aquatic Toxicology **96**(2): 151-158.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.017>.
- Canesi, L., G. Gallo, M. Gavioli and C. Pruzzo (2002). "Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves." Microscopy Research and Technique **57**(6): 469-476.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.10100>.
- Canesi, L., L. C. Lorusso, C. Ciacci, M. Betti and G. Gallo (2005). "Effects of the brominated flame retardant tetrabromobisphenol-A (TBBPA) on cell signaling and function of *Mytilus* hemocytes: involvement of MAP kinases and protein kinase C." Aquatic Toxicology **75**(3): 277-287.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.010>.
- Canesi, L., L. C. Lorusso, C. Ciacci, M. Betti, F. Regoli, G. Pojana, G. Gallo and A. Marcomini (2007a). "Effects of blood lipid lowering pharmaceuticals (bezafibrate and gemfibrozil) on immune and digestive gland functions of the bivalve mollusc, *Mytilus galloprovincialis*." Chemosphere.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.085>.
- Canesi, L., L. C. Lorusso, C. Ciacci, M. Betti, M. Rocchi, G. Pojana and A. Marcomini (2007b). "Immunomodulation of *Mytilus* hemocytes by individual estrogenic chemicals and environmentally relevant mixtures of estrogens: in vitro and in vivo studies." Aquatic Toxicology **81**(1): 36-44.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.10.010>.
- Cannon, J. P., R. N. Haire, N. Schnitker, M. G. Mueller and G. W. Litman (2004). "Individual protochordates have unique immune-type receptor repertoires." Current Biology **14**(12): R465-R466.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.009>.

- Cao, A., L. Mercado, J. I. Ramos-Martinez and R. Barcia (2003). "Primary cultures of hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* Lmk.: expression of IL-2R[alpha] subunit." Aquaculture **216**(1-4): 1-8.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00140-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00140-0).
- Carballal, M. J., C. Lopez, C. Azevedo and A. Villalba (1997a). "Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*." Journal of Invertebrate Pathology **70**(2): 96-105.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/jipa.1997.4670>.
- Carballal, M. J., C. Lopez, C. Azevedo and A. Villalba (1997b). "Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*." Dis Aquat Organ **29**: 127-135.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3354/dao029127>.
- Carballal, M. J., C. Lopez, C. Azevedo and A. Villalba (1997c). "In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes." Fish & Shellfish Immunology **7**(6): 403-416.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/fsim.1997.0094>.
- Carballal, M. J., A. Villalba and C. Lopez (1998). "Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development, and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis*." Journal of Invertebrate Pathology **72**(3): 304-312.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/jipa.1998.4779>.
- Cariou, J.-Y. (2002). "La formation de l'esprit scientifique -trois axes théoriques, un outil pratique : DiPHTeRIC." Bulletin pédagogique trimestriel de l'Association des Professeurs de Biologie et Géologie **2**.  
url.
- Castillo, M. G., M. S. Goodson and M. McFall-Ngai (2009). "Identification and molecular characterization of a complement C3 molecule in a lophotrochozoan, the Hawaiian bobtail squid *Euprymna scolopes*." Developmental & Comparative Immunology **33**(1): 69-76.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2008.07.013>.
- Cell Migration Consortium. (2013). "Cell Migration Gateway."  
from <http://cellmigration.org/index.shtml>.
- Cerenius, L., B. L. Lee and K. Soderhall (2008). "The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity." Trends Immunology **29**(6): 263-271.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2008.02.009>.
- Cerenius, L. and K. Soderhall (2004). "The prophenoloxidase-activating system in invertebrates." Immunological Reviews **198**: 116-126.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x>.
- Chapuy, B., R. Koch, U. Radunski, S. Corsham, N. Cheong, N. Inagaki, N. Ban, D. Wenzel, D. Reinhardt, A. Zapf, S. Schweyer, F. Kosari, W. Klapper, L. Truemper and G. G. Wulf (2008). "Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration." Leukemia **22**(8): 1576-1586.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2008.103>.
- Charlet, M., S. Chernysh, H. Philippe, C. Hetru, J. A. Hoffmann and P. Bulet (1996). "Innate Immunity: Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of mollusc, *Mytilus edulis*." Journal of Biological Chemistry **271**(36): 21808-21813.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.36.21808>.
- Charras, G. and E. Paluch (2008). "Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia." Nature Reviews Molecular Cell Biology **9**(9): 730-736.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2453>.
- Chen, J. H. and C. J. Bayne (1995a). "Bivalve mollusc hemocyte behaviors: characterization of hemocyte aggregation and adhesion and their inhibition in the California mussel (*Mytilus californianus*)." The Biological Bulletin **188**: 255-266.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/1542303>.
- Chen, J. H. and C. J. Bayne (1995b). "Hemocyte adhesion in the California mussel (*Mytilus californianus*): regulation by adenosine." Biochim Biophys Acta **1268**(2): 178-184.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0167-4889\(95\)00074-3](http://dx.doi.org/10.1016/0167-4889(95)00074-3).
- Cheng, T. C. (1976). "Beta-glucuronidase in the serum and hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica* (Mollusca: Pelecypoda)." Journal of Invertebrate Pathology **27**(1): 125-128.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(76\)90036-7](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(76)90036-7).

- Cheng, T. C. (1981). *Invertebrate Blood Cells: Bivalves*. London UK, Academic Press.
- Cheng, T. C. and K. H. Howland (1979). "Chemotactic attraction between hemocytes of the oyster, *Crassostrea virginica*, and bacteria." *Journal of Invertebrate Pathology* **33**(2): 204-210.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(79\)90154-X](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(79)90154-X).
- Chin, K. V., S. Tanaka, G. Darlington, I. Pastan and M. M. Gottesman (1990). "Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells." *Journal of Biological Chemistry* **265**(1): 221-226.  
url: <http://www.jbc.org/content/265/1/221.abstract>.
- Chong, A. S., P. N. Markham, H. M. Gebel, S. D. Bines and J. S. Coon (1993). "Diverse multidrug-resistance-modification agents inhibit cytolytic activity of natural killer cells." *Cancer Immunology Immunotherapy* **36**(2): 133-139.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01754414>.
- Choudhuri, S. and C. D. Klaassen (2006). "Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters." *Int J Toxicol* **25**(4): 231-259.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10915810600746023>.
- Chtanova, T., M. Schaeffer, S.-J. Han, G. G. van Dooren, M. Nollmann, P. Herzmark, S. W. Chan, H. Satija, K. Camfield, H. Aaron, B. Striepen and E. A. Robey (2008). "Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection." *Immunity* **29**(3): 487-496.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.012>.
- Ciacci, C., C. Barmo, R. Fabbri, B. Canonico, G. Gallo and L. Canesi (2011). "Immunomodulation in *Mytilus galloprovincialis* by non-toxic doses of hexavalent Chromium." *Fish & Shellfish Immunology* **31**(6): 1026-1033.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2011.09.002>.
- Clare, A. S. and G. Lumb (1994). "Identification of haemocytes and their role in clotting in the blue crab, *Callinectes sapidus*." *Marine Biology* **118**(4): 601-610.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00347507>.
- Clark, K. D., L. L. Pech and M. R. Strand (1997). "Isolation and identification of a plasmatocyte-spreading peptide from the hemolymph of the lepidopteran insect *Pseudoplusia includens*." *Journal of Biological Chemistry* **272**(37): 23440-23447.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.37.23440>.
- Clark, K. D., B. F. Volkman, H. Thoetkiattikul, D. King, Y. Hayakawa and M. R. Strand (2001). "Alanine-scanning mutagenesis of plasmatocyte spreading peptide identifies critical residues for biological activity." *Journal of Biological Chemistry* **276**(21): 18491-18496.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M100579200>.
- Clark, M. R. (2011). "Flippin' lipids." *Nature Immunology* **12**(5): 373-375.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2024>.
- Coates, T., R. Watts, R. Hartman and T. Howard (1992). "Relationship of F-actin distribution to development of polar shape in human polymorphonuclear neutrophils." *The Journal of Cell Biology* **117**(4): 765-774.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.117.4.765>.
- Cole, S. P., G. Bhardwaj, J. H. Gerlach, J. E. Mackie, C. E. Grant, K. C. Almquist, A. J. Stewart, E. U. Kurz, A. M. Duncan and R. G. Deeley (1992). "Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line." *Science* **258**(5088): 1650-1654.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1360704>.
- Coles, J. A. and R. K. Pipe (1994). "Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*." *Fish & Shellfish Immunology* **4**(5): 337-352.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/fsim.1994.1030>.
- Company, R., A. Serafim, M. J. Bebianno, R. Cosson, B. Shillito and A. Fiala-Medioni (2004). "Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*." *Marine Environmental Research* **58**(2-5): 377-381.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.083>.
- Cong, L., X. Yang, X. Wang, M. Tada, M. Lu, H. Liu and B. Zhu (2009). "Characterization of an i-type lysozyme gene from the sea cucumber *Stichopus japonicus*, and enzymatic and nonenzymatic antimicrobial activities of its recombinant protein." *J Biosci Bioeng* **107**(6): 583-588.

- DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.01.016>.
- Cooper, E. L. and P. Roch (1986). "Second-set allograft responses in the earthworm *Lumbricus terrestris*. Kinetics and characteristics." Transplantation **41**(4): 514-520.  
url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3961899>.
- Corbetta, S., A. Bairati and L. Vitellaro Zuccarello (2002). "Immunohistochemical study of subepidermal connective of molluscan integument." European Journal of Histochemistry **46**(3): 259-272.  
url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12472122>.
- Cornwall, R., B. Toomey, S. Bard, C. Bacon, W. Jarman and D. Epel (1995). "Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates." Aquatic Toxicology **31**: 277-296.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)00070-7](http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X(94)00070-7).
- Cosson, P. and T. Soldati (2008). "Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria." Current Opinion in Microbiology **11**(3): 271-276.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2008.05.005>.
- Costa, M. M., S. Dios, J. Alonso-Gutierrez, A. Romero, B. Novoa and A. Figueras (2009). "Evidence of high individual diversity on myticin C in mussel (*Mytilus galloprovincialis*)." Developmental & Comparative Immunology **33**(2): 162-170.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2008.08.005>.
- Costa, M. M., M. Prado-Alvarez, C. Gestal, H. Li, P. Roch, B. Novoa and A. Figueras (2009). "Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria." Fish & Shellfish Immunology **26**(3): 515-523.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.02.001>.
- Costigliola, N., M. T. Kapustina, G. E. Weinreb, A. Monteith, Z. Rajfur, Timothy C. Elston and K. Jacobson (2010). "RhoA regulates calcium-independent periodic contractions of the cell cortex." Biophysical Journal **99**(4): 1053-1063.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2010.06.010>.
- Crozatier, M. and M. Meister (2007). "*Drosophila* haematopoiesis." Cell Microbiology **9**(5): 1117-1126.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00930.x>.
- Cunha, C., A. Carvalho, A. Esposito, F. Bistoni and L. Romani (2012). "DAMP signaling in fungal infections and diseases." Frontiers in Immunology **3**.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00286>.
- D'Autreaux, B. and M. B. Toledano (2007). "ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis." Nature Reviews Molecular Cell Biology **8**(10): 813-824.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2256>.
- Dahlgren, C. and A. Karlsson (1999). "Respiratory burst in human neutrophils." Journal of Immunological Methods **232**(1-2): 3-14.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00146-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00146-5).
- Dallas, S., L. Schlichter and R. Bendayan (2004). "Multidrug Resistance Protein (MRP) 4- and MRP 5-Mediated Efflux of 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenine by Microglia." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **309**(3): 1221-1229.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.103.063966>.
- Danilova, N. (2006). "The evolution of immune mechanisms." Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution **306B**(6): 496-520.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jez.b.21102>.
- Daughton, C. G. and T. A. Ternes (1999). "Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?" Environmental Health Perspectives **107 Suppl 6**: 907-938.  
url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1566206/>.
- Davies, P. S. and T. Partridge (1972). "Limpet haemocytes. I. Studies on aggregation and spike formation." Journal of Cell Science **11**(3): 757-769.  
url: <http://jcs.biologists.org/content/11/3/757.long>.
- De Hauwer, C., I. Camby, F. Darro, C. Decaestecker, T. Gras, I. Salmon, R. Kiss and P. Van Ham (1997). "Dynamic Characterization of Glioblastoma Cell Motility." Biochemical and Biophysical Research Communications **232**(2): 267-272.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1997.6291>.

- De Vico, G. and F. Carella (2012). "Morphological features of the inflammatory response in molluscs." Research in Veterinary Science **93**(3): 1109-1115.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.03.014>.
- Deeley, R. G., C. Westlake and S. P. Cole (2006). "Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins." Physiological Reviews **86**(3): 849-899.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00035.2005>.
- Delaporte, M., P. Soudant, C. Lambert, M. Jegaden, J. Moal, S. Pouvreau, L. Dégremont, P. Boudry and J.-F. Samain (2007). "Characterisation of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **353**(1): 45-57.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2007.09.003>.
- Delaporte, M., P. Soudant, C. Lambert, J. Moal, S. Pouvreau and J.-F. Samain (2006). "Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle." Aquaculture **254**(1-4): 571-582.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.006>.
- Della Torre, C., E. Bocci, S. E. Focardi and I. Corsi (2013). "Differential ABCB and ABCC gene expression and efflux activities in gills and hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* and their involvement in cadmium response." Marine Environmental Research(0).  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.06.005>.
- di Masi, A., E. D. Marinis, P. Ascenzi and M. Marino (2009). "Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects." Molecular Aspects of Medicine **30**(5): 297-343.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2009.04.002>.
- Diz-Muñoz, A., M. Krieg, M. Bergert, I. Ibarlucea-Benitez, D. J. Muller, E. Paluch and C.-P. Heisenberg (2010). "Control of directed cell migration *in vivo* by membrane-to-cortex attachment." PLOS Biology **8**(11): e1000544.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000544>.
- Dodd, R. B. and K. Drickamer (2001). "Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity." Glycobiology **11**(5): 71R-79R.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/11.5.71R>.
- Donaghy, L., E. Kraffe, N. Le Goïc, C. Lambert, A. K. Volety and P. Soudant (2012). "Reactive Oxygen Species in unstimulated hemocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement." PLoS ONE **7**(10): e46594.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0046594>.
- Dong, Y., H. E. Taylor and G. Dimopoulos (2006). "AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system." PLOS Biology **4**(7): e229.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0040229>.
- Doolittle, R. F. (1992). "A detailed consideration of a principal domain of vertebrate fibrinogen and its relatives." Protein Science **1**(12): 1563-1577.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/pro.5560011204>.
- Doytchinova, I. A., P. Taylor and D. R. Flower (2003). "Proteomics in vaccinology and immunobiology: an informatics perspective of the immunone." Journal of Biomedicine and Biotechnology **2003**(5): 267-290.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/s1110724303209232>.
- Drach, J., A. Gsur, G. Hamilton, S. Zhao, J. Angerler, M. Fiegl, N. Zojer, M. Raderer, I. Haberl, M. Andreeff and H. Huber (1996). "Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes." Blood **88**(5): 1747-1754.  
url: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/88/5/1747.abstract>.
- Drickamer, K. and M. E. Taylor (1993). "Biology of animal lectins." Annual Review of Cell Biology **9**(1): 237-264.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cb.09.110193.001321>.
- Duchemin, M. B., M. Auffret, N. Wessel, M. Fortier, Y. Morin, J. Pellerin and M. Fournier (2008). "Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through *in vivo*, *in tubo* and *in vitro* exposures." Environmental Pollution **153**(2): 416-423.

- DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2007.08.015>.
- Dupuy, A. G. and E. Caron (2008). "Integrin-dependent phagocytosis – spreading from microadhesion to new concepts." *Journal of Cell Science* **121**(11): 1773-1783.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.018036>.
- During, K., P. Porsch, A. Mahn, O. Brinkmann and W. Gieffers (1999). "The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes." *FEBS Letters* **449**(2-3): 93-100.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00405-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00405-6).
- Dyrynda, E. A., R. K. Pipe, G. R. Burt and N. A. Ratcliffe (1998). "Modulations in the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK." *Aquatic Toxicology* **42**(3): 169-185.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(97\)00095-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(97)00095-7).
- Dyrynda, E. A., R. K. Pipe and N. A. Ratcliffe (1997). "Sub-populations of haemocytes in the adult and developing marine mussel, *Mytilus edulis*, identified by use of monoclonal antibodies." *Cell and Tissue Research* **289**(3): 527-536.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s004410050898>.
- Dzik, J. M. (2010). "The ancestry and cumulative evolution of immune reactions." *Acta Biochim Pol* **57**(4): 443-466.  
url: [http://www.actabp.pl/pdf/4\\_2010/443.pdf](http://www.actabp.pl/pdf/4_2010/443.pdf).
- Ebrahimzadeh, P. R., C. Högfors and M. Braide (2000). "Neutrophil chemotaxis in moving gradients of fMLP." *Journal of Leukocyte Biology* **67**(5): 651-661.  
url: <http://www.jleukbio.org/content/67/5/651.abstract>.
- Edelman, G. M., I. Yahara and J. L. Wang (1973). "Receptor mobility and receptor-cytoplasmic interactions in lymphocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **70**(5): 1442-1446.  
url: <http://www.pnas.org/content/70/5/1442.full.pdf>.
- Eilken, H. M. and R. H. Adams (2010). "Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis." *Current Opinion in Cell Biology* **22**(5): 617-625.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.010>.
- Elliott, J. I., S. Raguz and C. F. Higgins (2004). "Multidrug transporter activity in lymphocytes." *British Journal of Pharmacology* **143**(7): 899-907.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0705940>.
- Elsayed, E. E., S. M. McLaughlin and M. Faisal (1999). "Protease inhibitors in plasma of the softshell clam *Mya arenaria*: identification and effects of disseminated sarcoma." *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **123**(4): 427-435.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0305-0491\(99\)00089-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0305-0491(99)00089-9).
- Elston, R. (1997). "Bivalve mollusc viruses." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **13**(4): 393-403.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1023/a:1018520115691>.
- Epel, D., T. Luckenbach, C. N. Stevenson, L. A. Macmanus-Spencer, A. Hamdoun and T. Smital (2008). "Efflux transporters: newly appreciated roles in protection against pollutants." *Environmental Science & Technology* **42**(11): 3914-3920.  
url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3160781/>.
- Ermak, T. (1976). The hematogenic tissue of tunicates. *The Phylogeny of Thymus and Bone Marrow-Bursa Cells*, R.K. Wright and E.L. Cooper, Elsevier/North Holland, Amsterdam: pp. 45-56.
- Escoubas, J.-M., L. Briant, C. Montagnani, S. Hez, C. Devaux and P. Roch (1999). "Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues." *FEBS Letters* **453**(3): 293-298.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00737-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00737-1).
- Espinosa, E. P., M. Perrigault, J. E. Ward, S. E. Shumway and B. Allam (2009). "Lectins associated with the feeding organs of the oyster *Crassostrea virginica* can mediate particle selection." *The Biological Bulletin* **217**(2): 130-141.  
url: <http://www.biolbull.org/content/217/2/130.long>.
- Espinosa, E. P., M. Perrigault, J. E. Ward, S. E. Shumway and B. Allam (2010). "Microalgal cell surface carbohydrates as recognition sites for particle sorting in suspension-feeding bivalves." *The Biological Bulletin* **218**(1): 75-86.  
url: <http://www.biolbull.org/content/218/1/75.abstract>.
- Etienne-Manneville, S. (2004). "Cdc42--the centre of polarity." *Journal of Cell Science* **117**(Pt 8): 1291-1300.

- DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.01115>.
- Eufemia, N., S. Clerte, S. Girshick and D. Epel (2002). "Algal products as naturally occurring substrates for p-glycoprotein in *Mytilus californianus*." Marine Biology **140**(2): 343-353.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s002270100693>.
- Eufemia, N. A. and D. Epel (2000). "Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses." Aquatic Toxicology **49**(1-2): 89-100.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00068-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00068-5).
- Fache, S. (2005). **Thèse**: Motilité sous flux hydrodynamique et étalement de *Dictyostelium discoideum*, Université Joseph, Fourier.
- Faisal, M., E. A. MacIntyre, K. G. Adham, B. D. Tall, M. H. Kothary and J. F. La Peyre (1998). "Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **121**(2): 161-168.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0305-0491\(98\)10084-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0305-0491(98)10084-6).
- Fawcett, L. B. and M. R. Tripp (1994). "Chemotaxis of *Mercenaria mercenaria* hemocytes to bacteria in vitro." Journal of Invertebrate Pathology **63**(3): 275-284.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/jipa.1994.1052>.
- Feller, N., H. J. Broxterman, D. C. R. Währer and H. M. Pinedo (1995). "ATP-dependent efflux of calcein by the multidrug resistance protein (MRP): no inhibition by intracellular glutathione depletion." FEBS Letters **368**(2): 385-388.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00677-2](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(95)00677-2).
- Fisher, W. S. (1986). Structure and Functions of Oyster Hemocytes. Immunity in Invertebrates. M. Brehélin, Springer Berlin Heidelberg: 25-35.
- Fisher, W. S. and A. R. DiNuzzo (1991). "Agglutination of bacteria and erythrocytes by serum from six species of marine molluscs." Journal of Invertebrate Pathology **57**(3): 380-394.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(91\)90142-D](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(91)90142-D).
- Fisheries and Aquaculture Department, F. (2012). "*Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758), Interest to Fisheries." from <http://www.fao.org/fishery/species/2688/en>.
- Flajnik, M. F. and L. Du Pasquier (2004). "Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line?" Trends in Immunology **25**(12): 640-644.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2004.10.001>.
- Fleury, C., A. Serpentine, M. Kypriotou, E. Renard, P. Galéra and J.-M. Lebel (2011). "Characterization of a non-fibrillar-related collagen in the mollusc *Haliotis tuberculata* and its biological activity on human dermal fibroblasts." Marine Biotechnology **13**(5): 1003-1016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-011-9364-9>.
- Foley, D. A. and T. C. Cheng (1975). "A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*." Journal of Invertebrate Pathology **25**(2): 189-197.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(75\)90068-3](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(75)90068-3).
- Ford, S. E., S. A. Kanaley and D. T. J. Littlewood (1993). "Cellular responses of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni*: changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes." Journal of Invertebrate Pathology **61**(1): 49-57.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/jipa.1993.1009>.
- Fougereau, M. (2007). "De l'immunité innée à l'immunité adaptative : un continuum." Bulletin - Académie Vétérinaire de France **160**(3): 181-189.  
url: <http://academieveterinaire.free.fr/academie/fougereau.pdf>.
- Franchini, A. and E. Ottaviani (2000). "Repair of molluscan tissue injury: role of PDGF and TGF- $\beta$ ." Tissue and Cell **32**(4): 312-321.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1054/tice.2000.0118>.
- Francisco, C. J., M. A. Hermida and M. J. Santos (2010). "Parasites and symbionts from *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) (Bivalves: *Mytilidae*) of the Aveiro Estuary Portugal." Journal for Parasitology **96**(1): 200-205.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1645/GE-2064.1>.

- Freitas, M., J. L. Lima and E. Fernandes (2009). "Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review." Analytica Chimica Acta **649**(1): 8-23.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.06.063>.
- Friedl, P. and D. Gilmour (2009). "Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer." Nature Reviews Molecular Cell Biology **10**(7): 445-457.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2720>.
- Friedl, P. and J. Storim (2004). "Diversity in immune-cell interactions: states and functions of the immunological synapse." Trends in Cell Biology **14**(10): 557-567.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.005>.
- Friedl, P. and B. Weigelin (2008). "Interstitial leukocyte migration and immune function." Nature Immunology **9**(9): 960-969.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.f.212>.
- Friedl, P. and K. Wolf (2010). "Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model." The Journal of Cell Biology **188**(1): 11-19.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200909003>.
- Fromm, M. F. (2002). "Genetically determined differences in P-glycoprotein function: implications for disease risk." Toxicology **181-182**(0): 299-303.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00297-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00297-4).
- Fu, D., M. Bebawy, E. P. W. Kable and B. D. Roufogalis (2004). "Dynamic and intracellular trafficking of P-glycoprotein-EGFP fusion protein: Implications in multidrug resistance in cancer." International Journal of Cancer **109**(2): 174-181.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.11659>.
- Gagnaire, B. (2005). **Thèse:** Étude des effets des polluants sur les paramètres hématologiques de l'huître creuse *Crassostrea gigas*: interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses, Université de La Rochelle.
- Galgani, F., R. Cornwall, B. H. Toomey and D. D. Epel (1996). "Interaction of environmental xenobiotics with a multixenobiotic defense mechanism in the bay mussel *Mytilus galloprovincialis* from the coast of California." Environmental Toxicology and Chemistry **15**(3): 325-331.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620150316>.
- Galli, S. J., S. Nakae and M. Tsai (2005). "Mast cells in the development of adaptive immune responses." Nature Immunology **6**(2): 135-142.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ni1158>.
- Galloway, T. S. and M. H. Depledge (2001). "Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance." Ecotoxicology **10**(1): 5-23.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008939520263>.
- Ganz, T. (2003). "Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity." Nature Reviews Immunology **3**(9): 710-720.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nri1180>.
- Garcia-Garcia, E., M. Prado-Alvarez, B. Novoa, A. Figueras and C. Rosales (2008). "Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families." Developmental and comparative immunology **32**(6): 637-653.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2007.10.004>.
- Gardel, M. L., I. C. Schneider, Y. Aratyn-Schaus and C. M. Waterman (2010). "Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration." Annual Review of Cell and Developmental Biology **26**: 315-333.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.011209.122036>.
- Gasque, P. (2004). "Complement: a unique innate immune sensor for danger signals." Mol Immunol **41**(11): 1089-1098.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2004.06.011>.
- Geiger, B., J. P. Spatz and A. D. Bershadsky (2009). "Environmental sensing through focal adhesions." Nature Reviews Molecular Cell Biology **10**(1): 21-33.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2593>.

- George, S. G. and B. J. S. Pirie (1980). "Metabolism of zinc in the mussel, *Mytilus edulis* (L.): a combined ultrastructural and biochemical study." Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom **60**(03): 575-590.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0025315400040273>.
- George, S. G., B. J. S. Pirie, A. R. Cheyne, T. L. Coombs and P. T. Grant (1978). "Detoxication of metals by marine bivalves: An ultrastructural study of the compartmentation of copper and zinc in the oyster *Ostrea edulis*." Marine Biology **45**(2): 147-156.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00390550>.
- Gerdol, M., G. De Moro, C. Manfrin, P. Venier and A. Pallavicini (2012). "Big defensins and mytimacins, new AMP families of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*." Developmental & Comparative Immunology **36**(2): 390-399.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2011.08.003>.
- Germain, R. N., E. A. Robey and M. D. Cahalan (2012). "A decade of imaging cellular motility and interaction dynamics in the immune system." Science **336**(6089): 1676-1681.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1221063>.
- Germann, U. A. (1996). "P-glycoprotein--a mediator of multidrug resistance in tumour cells." (0959-8049 (Print)).  
url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8095827>.
- Gestal, C., A. Pallavicini, P. Venier, B. Novoa and A. Figueras (2010). "MgC1q, a novel C1q-domain-containing protein involved in the immune response of *Mytilus galloprovincialis*." Developmental & Comparative Immunology **34**(9): 926-934.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2010.02.012>.
- Gestal, C., P. Roch, T. Renault, A. Pallavicini, C. Paillard, B. Novoa, R. Oubella, P. Venier and A. Figueras (2008). "Study of diseases and the immune system of bivalves using molecular biology and genomics." Reviews in Fisheries Science **16**(sup1): 133-156.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10641260802325518>.
- Ghetie, M. A., V. Ghetie and E. S. Vitetta (1999). "Anti-CD19 antibodies inhibit the function of the P-gp pump in multidrug-resistant B lymphoma cells." Clinical Cancer Research **5**(12): 3920-3927.  
url: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/5/12/3920.long>.
- Giovine, M., M. Pozzolini, A. Favre, G. Bavestrello, C. Cerrano, F. Ottaviani, L. Chiarantini, A. Cerasi, M. Cangiotti, E. Zocchi, S. Scarfi, M. Sara and U. Benatti (2001). "Heat stress-activated, calcium-dependent nitric oxide synthase in sponges." Nitric Oxide **5**(5): 427-431.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/niox.2001.0366>.
- Gokudan, S., T. Muta, R. Tsuda, K. Koori, T. Kawahara, N. Seki, Y. Mizunoe, S. N. Wai, S. Iwanaga and S.-i. Kawabata (1999). "Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(18): 10086-10091.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.18.10086>.
- Goldberg, E. D. (1975). "The mussel watch — A first step in global marine monitoring." Marine Pollution Bulletin **6**(7): 111.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0025-326x\(75\)90271-4](http://dx.doi.org/10.1016/0025-326x(75)90271-4).
- Goldstein, L. J., H. Galski, A. Fojo, M. Willingham, S. L. Lai, A. Gazdar, R. Pirker, A. Green, W. Crist, G. M. Brodeur and et al. (1989). "Expression of a multidrug resistance gene in human cancers." Journal of the National Cancer Institute **81**(2): 116-124.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/81.2.116>.
- Goldstein, N. I., P. B. Fisher and C. P. Schaffner (1977). "Effect of polyene macrolide antibiotics on invertebrate tissue culture cells." Journal of Antibiotics **30**(4): 321-325.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.30.321>.
- Gomez-Mendikute, A. and M. P. Cajaraville (2003). "Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes." Toxicology in Vitro **17**(5-6): 539-546.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0887-2333\(03\)00093-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00093-6).
- Gomez-Mendikute, A., A. Etxebarria, I. Olabarrieta and M. P. Cajaraville (2002). "Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo(a)pyrene." Marine Environmental Research **54**(3-5): 431-436.

- DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(02\)00177-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00177-0).
- Gorbushin, A. M. and N. V. Iakovleva (2011). "A new gene family of single fibrinogen domain lectins in *Mytilus*." *Fish & Shellfish Immunology* **30**(1): 434-438.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.10.002>.
- Gorbushin, A. M., Y. V. Panchin and N. V. Iakovleva (2010). "In search of the origin of FREPs: Characterization of *Aplysia californica* fibrinogen-related proteins." *Developmental & Comparative Immunology* **34**(4): 465-473.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2009.12.007>.
- Gosling, E. (2003). *Bivalve molluscs: biology, ecology and culture*.
- Gottesman, M. M. and S. V. Ambudkar (2001). "Overview: ABC transporters and human disease." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **33**(6): 453-458.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1012866803188>.
- Gottesman, M. M. and I. Pastan (1988). "The multidrug transporter, a double-edged sword." *Journal of Biological Chemistry* **263**(25): 12163-12166.  
url: <http://www.jbc.org/content/263/25/12163.short>.
- Gottesman, M. M., I. Pastan and S. V. Ambudkar (1996). "P-glycoprotein and multidrug resistance." *Curr Opin Genet Dev* **6**(5): 610-617.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-437X\(96\)80091-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-437X(96)80091-8).
- Gourdine, J. P., A. Markiv and J. Smith-Ravin (2007). "The three-dimensional structure of codakine and related marine C-type lectins." *Fish and Shellfish Immunology* **23**(4): 831-839.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2007.03.009>.
- Graham, D. B., B. H. Zinselmeyer, F. Mascarenhas, R. Delgado, M. J. Miller and W. Swat (2009). "ITAM signaling by Vav family Rho guanine nucleotide exchange factors regulates interstitial transit rates of neutrophils *In Vivo*." *PLoS ONE* **4**(2): e4652.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004652>.
- Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen and M. L. Dustin (1999). "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation." *Science* **285**(5425): 221-227.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.285.5425.221>.
- Groves, E., A. E. Dart, V. Covarelli and E. Caron (2008). "Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells." *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**(13): 1957-1976.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-7578-4>.
- Gupta, S., C. H. Kim, T. Tsuruo and S. Gollapudi (1992). "Preferential expression and activity of multidrug resistance gene 1 product (P-glycoprotein), a functionally active efflux pump, in human CD8+ T cells: a role in cytotoxic effector function." *J Clin Immunol* **12**(6): 451-458.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00918857>.
- Gupton, S. L. and F. B. Gertler (2007). "Filopodia: the fingers that do the walking." *Signal Transduction Knowledge Environment* **2007**(400): re5.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/stke.4002007re5>.
- Haapaniemi, H., M. Tomita, N. Tanahashi, H. Takeda, M. Yokoyama and Y. Fukuuchi (1995). "Non-amoeboid locomotion of cultured microglia obtained from newborn rat brain." *Neuroscience Letters* **193**(2): 121-124.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11683-N](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940(95)11683-N).
- Hagger, J. A., M. H. Depledge and T. S. Galloway (2005). "Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*." *Marine Pollution Bulletin* **51**(8-12): 811-816.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.06.044>.
- Hamilton, R., M. Siva-Jothy and M. Boots (2008). "Two arms are better than one: parasite variation leads to combined inducible and constitutive innate immune responses." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **275**(1637): 937-945.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2007.1574>.
- Hampton, M. B., A. J. Kettle and C. C. Winterbourn (1998). "Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing." *Blood* **92**(9): 3007-3017.  
url: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/92/9/3007.short>.

- Hancock, R. E., K. L. Brown and N. Mookherjee (2006). "Host defence peptides from invertebrates--emerging antimicrobial strategies." Immunobiology **211**(4): 315-322.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.017>.
- Hartenstein, V. (2006). "Blood cells and blood cell development in the animal kingdom." Annual Review of Cell and Developmental Biology **22**(1): 677-712.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010605.093317>.
- Hasegawa, H., D. N. Gharaibeh, E. J. Lind and C. C. Hase (2009). "Virulence of metalloproteases produced by *Vibrio* species on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae." Dis Aquat Organ **85**(2): 123-131.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3354/dao02070>.
- Hasegawa, H., E. J. Lind, M. A. Boin and C. C. Häse (2008). "The extracellular metalloprotease of *Vibrio tubiashii* is a major virulence factor for pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae." Appl Environ Microbiol **74**(13): 4101-4110.  
url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2446533/>.
- Hattan, S. J., T. M. Laue and N. D. Chasteen (2001). "Purification and characterization of a novel calcium-binding protein from the extrapallial fluid of the mollusc, *Mytilus edulis*." Journal of Biological Chemistry **276**(6): 4461-4468.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M006803200>.
- Hennessy, M. and J. P. Spiers (2007). "A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter." Pharmacological Research **55**(1): 1-15.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2006.10.007>.
- Hernroth, B. (2003). "Factors influencing bactericidal activity of blue mussel (*Mytilus edulis*) haemocytes against *Salmonella typhimurium*." Fish & Shellfish Immunology **14**(2): 93-104.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/fsim.2001.0421>.
- Hertel, L. A., C. M. Adema and E. S. Loker (2005). "Differential expression of FREP genes in two strains of *Biomphalaria glabrata* following exposure to the digenetic trematodes *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*." Developmental & Comparative Immunology **29**(4): 295-303.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2004.08.003>.
- Higgins, C. F. (1992). "ABC transporters: from microorganisms to man." Annual Review of Cell and Developmental Biology **8**: 67-113.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cb.08.110192.000435>.
- Higgins, C. F. and M. M. Gottesman (1992). "Is the multidrug transporter a flippase?" Trends in Biochemical Sciences **17**(1): 18-21.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0968-0004\(92\)90419-A](http://dx.doi.org/10.1016/0968-0004(92)90419-A).
- Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway and R. A. B. Ezekowitz (1999). "Phylogenetic perspectives in innate immunity." Science **284**(5418): 1313-1318.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.284.5418.1313>.
- Hoffmann, J. A., D. Zachary, D. Hoffmann, M. Brehélin and A. Porte (1979). Postembryonic development and differentiation: hemopoietic tissues and their functions in some insects. Insect Hemocytes, Cambridge University Press: 29-66.
- Höher, N., A. Köhler, J. Strand and K. Broeg (2012). "Effects of various pollutant mixtures on immune responses of the blue mussel (*Mytilus edulis*) collected at a salinity gradient in Danish coastal waters." Marine Environmental Research **75**(0): 35-44.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.11.003>.
- Holland, I. B. and M. A. Blight (1999). "ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans." Journal of Molecular Biology **293**(2): 381-399.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1999.2993>.
- Holz, A., B. Bossinger, T. Strasser, W. Janning and R. Klapper (2003). "The two origins of hemocytes in *Drosophila*." Development **130**(20): 4955-4962.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.00702>.
- Honig, S. M., S. Fu, X. Mao, A. Yopp, M. D. Gunn, G. J. Randolph and J. S. Bromberg (2003). "FTY720 stimulates multidrug transporter- and cysteinyl leukotriene-dependent T cell chemotaxis to lymph nodes." Journal of Clinical Investigation **111**(5): 627-637.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1172/jci16200>.

- Hose, J. E., G. G. Martin and A. S. Gerard (1990). "A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function." *The Biological Bulletin* **178**(1): 33-45.  
url: <http://www.biolbull.org/content/178/1/33.abstract>.
- Hostikka, S. L. and K. Tryggvason (1988). "The complete primary structure of the alpha 2 chain of human type IV collagen and comparison with the alpha 1(IV) chain." *Journal of Biological Chemistry* **263**(36): 19488-19493.  
url: <http://www.jbc.org/content/263/36/19488.abstract>.
- Howland, K. H. and T. C. Cheng (1982). "Identification of bacterial chemoattractants for oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes." *Journal of Invertebrate Pathology* **39**(2): 123-132.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(82\)90001-5](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(82)90001-5).
- Hubert, F., T. Noël and P. Roch (1996). "A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*)." *European Journal of Biochemistry* **240**(1): 302-306.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0302h.x>.
- Hughes, T. K., Jr., E. M. Smith, J. A. Barnett, R. Charles and G. B. Stefano (1991a). "Lipopolysaccharide and opioids activate distinct populations of *Mytilus edulis* immunocytes." *Cell and Tissue Research* **264**(2): 317-320.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00313968>.
- Hughes, T. K., Jr., E. M. Smith, J. A. Barnett, R. Charles and G. B. Stefano (1991b). "LPS stimulated invertebrate hemocytes: a role for immunoreactive TNF and IL-1." *Developmental & Comparative Immunology* **15**(3): 117-122.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0145-305X\(91\)90002-G](http://dx.doi.org/10.1016/0145-305X(91)90002-G).
- Huttenlocher, A. and A. R. Horwitz (2011). "Integrins in cell migration." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**(9).  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a005074>.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell* **110**(6): 673-687.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00971-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6).
- Ince, T. A. and K. W. Scotto (1995). "A conserved downstream element defines a new class of RNA polymerase II promoters." *Journal of Biological Chemistry* **270**(51): 30249-30252.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.51.30249>.
- Ishikawa, T., M. T. Kuo, K. Furuta and M. Suzuki (1998). "A new aspect on glutathione-associated biological function of MRP/GS-X pump and its gene expression." *Cytotechnology* **27**(1-3): 81-93.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008036015156>.
- Itoh, N., Q. Xue, Y. Li, R. K. Cooper and J. F. La Peyre (2007). "cDNA cloning and tissue expression of plasma lysozyme in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*." *Fish & Shellfish Immunology* **23**(5): 957-968.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2007.03.006>.
- Iwanaga, S. and B. L. Lee (2005). "Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals." *Journal of biochemistry and molecular biology* **38**(2): 128-150.  
url: [http://jbmb.or.kr/jbmb/jbmb\\_files/\[38-2\]0503251824\\_128\\_2.pdf](http://jbmb.or.kr/jbmb/jbmb_files/[38-2]0503251824_128_2.pdf).
- Janer, G., R. Lavado, R. Thibaut and C. Porte (2005). "Effects of 17 $\beta$ -estradiol exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: A possible regulating role for steroid acyltransferases." *Aquatic Toxicology* **75**(1): 32-42.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.01.012>.
- Janeway, C. A. (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54**: 1-13.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/sqb.1989.054.01.003>.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." *Annual Review of Immunology* **20**: 197-216.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>.
- Janeway, C. A., K. Murphy, P. Travers, P. L. Masson and M. Walport (2009). *Immunobiologie*, De Boeck Supérieur.
- Jayaraj, S., R. Thiagarajan and S. Vincent (2009). "Encapsulation response from the hemocytes of marine mussel *Perna viridis*." *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* **4**(2): 138-142.  
url: [www.idosi.org/gjbb/gjbb4\(2\)09/11.pdf](http://www.idosi.org/gjbb/gjbb4(2)09/11.pdf).

- Jeong, K. H., K. J. Lie and D. Heyneman (1983). "The ultrastructure of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*." Developmental & Comparative Immunology **7**(2): 217-228.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0145-305X\(83\)90003-4](http://dx.doi.org/10.1016/0145-305X(83)90003-4).
- Jerne, N. K. (1955). "The natural-selection theory of antibody formation." Proceedings of the National Academy of Sciences **41**(11): 849-857.  
url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16589759>.
- Jiang, F., Y. Zhang and G. J. Dusting (2011). "NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair." Pharmacol Rev **63**(1): 218-242.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1124/pr.110.002980>.
- Jin, T., X. Xu, J. Fang, N. Isik, J. Yan, J. Brzostowski and D. Hereld (2009). "How human leukocytes track down and destroy pathogens: lessons learned from the model organism *Dictyostelium discoideum*." Immunologic Research **43**(1-3): 118-127.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-008-8056-7>.
- Jiravanichpaisal, P., B. L. Lee and K. Söderhäll (2006). "Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization." Immunobiology **211**(4): 213-236.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.015>.
- Johansson, M. W., P. Keyser, K. Sritunyaluksana and K. Söderhäll (2000). "Crustacean haemocytes and haematopoiesis." Aquaculture **191**(1-3): 45-52.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00418-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00418-X).
- Johnstone, M. B., S. Ellis and A. S. Mount (2008). "Visualization of shell matrix proteins in hemocytes and tissues of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*." Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution **310B**(3): 227-239.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jez.b.21206>.
- Johnstone, R. W., A. A. Ruefli and M. J. Smyth (2000). "Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein?" Trends in Biochemical Sciences **25**(1): 1-6.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01493-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01493-0).
- Jones, G. E., R. Gillett and T. Partridge (1976). "Rapid modification of the morphology of cell contact sites during the aggregation of limpet haemocytes." Journal of Cell Science **22**(1): 21-33.  
url: <http://jcs.biologists.org/content/22/1/21.long>.
- Jones, G. E. and T. Partridge (1974). "Limpet haemocytes. III. Effects of cytochalasin B and colchicine on cell spreading and aggregation." Journal of Cell Science **16**(2): 385-399.  
url: <http://jcs.biologists.org/content/16/2/385.long>.
- Juliano, R. L. and V. Ling (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." Biochim Biophys Acta **455**(1): 152-162.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90160-7](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2736(76)90160-7).
- Kadar, E., D. M. Lowe, M. Sole, A. S. Fisher, A. N. Jha, J. W. Readman and T. H. Hutchinson (2010). "Uptake and biological responses to nano-Fe versus soluble FeCl<sub>3</sub> in excised mussel gills." Anal Bioanal Chem **396**(2): 657-666.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-009-3191-0>.
- Kang, Y.-S., Y.-M. Kim, K.-I. Park, S. Kim Cho, K.-S. Choi and M. Cho (2006). "Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*." Developmental & Comparative Immunology **30**(12): 1119-1131.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2006.03.005>.
- Kappler, J., R. Kubo, K. Haskins, C. Hannum, P. Marrack, M. Pigeon, B. McIntyre, J. Allison and I. Trowbridge (1983). "The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells in mouse and man: identification of constant and variable peptides." Cell **35**(1): 295-302.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90232-5](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(83)90232-5).
- Kataranovski, M., D. Kataranovski, D. Savic, G. Jovicic, Z. Bogdanovic and T. Jovanovic (1998). "Granulocyte and plasma cytokine activity in acute cadmium intoxication in rats." Physiological Research **47**(6): 453-461.  
url: [http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/47/47\\_453.pdf](http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/47/47_453.pdf).
- Kawabata, S. and S. Iwanaga (1999). "Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab." Developmental & Comparative Immunology **23**(4-5): 391-400.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00019-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00019-1).

- Kepler, C. and A. H. Ringwood (2001). "Expression of P-glycoprotein in the gills of oysters, *Crassostrea virginica*: seasonal and pollutant related effects." *Aquatic Toxicology* **54**(3–4): 195-204.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00151-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00151-5).
- Khalturin, K. and T. C. G. Bosch (2007). "Self/nonself discrimination at the basis of chordate evolution: limits on molecular conservation." *Current Opinion in Immunology* **19**(1): 4-9.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2006.11.001>.
- Khalturin, K., U. Kurn, N. Pinnow and T. C. Bosch (2005). "Towards a molecular code for individuality in the absence of MHC: screening for individually variable genes in the urochordate *Ciona intestinalis*." *Developmental & Comparative Immunology* **29**(9): 759-773.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2005.01.006>.
- Kilpatrick, D. C. (2002). "Animal lectins: a historical introduction and overview." *Biochim Biophys Acta* **1572**(2-3): 187-197.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00308-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00308-2).
- Kim, Y. and E. N. Powell (2007). "Distribution of parasites and pathologies in sentinel bivalves: NOAA status and trends "Mussel Watch" program." *Journal of Shellfish Research* **26**(4): 1115-1151.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000\(2007\)26\[1115:DOPAPI\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[1115:DOPAPI]2.0.CO;2).
- Kimbrough, K. L. (2008). *An assessment of two decades of contaminant monitoring in the nation's coastal zone*. Silver Spring, Md. :, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Ocean Service, National Centers for Coastal Ocean Science, Center for Coastal Monitoring and Assessment.
- Klein, I., B. Sarkadi and A. Varadi (1999). "An inventory of the human ABC proteins." *Biochim Biophys Acta* **1461**(2): 237-262.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00161-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00161-3).
- Klimecki, W., B. Futscher, T. Grogan and W. Dalton (1994). "P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers." *Blood* **83**(9): 2451-2458.  
url: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/83/9/2451.abstract>.
- Knutsen, T., L. A. Mickley, T. Ried, E. D. Green, S. du Manoir, E. Schröck, M. Macville, Y. Ning, R. Robey, M. Polymeropoulos, R. Torres and T. Fojo (1998). "Cytogenetic and molecular characterization of random chromosomal rearrangements activating the drug resistance gene, MDR1/P-glycoprotein, in drug-selected cell lines and patients with drug refractory ALL." *Genes, Chromosomes and Cancer* **23**(1): 44-54.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2264\(199809\)23:1<44::AID-GCC7>3.0.CO;2-6](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2264(199809)23:1<44::AID-GCC7>3.0.CO;2-6).
- Köhler, A., B. Lauritzen, D. Jansen, P. Böttcher, L. Teguliwa, G. Krüner and K. Broeg (1998). "Detection of P-glycoprotein mediated MDR/MXR in *Caranus maenas* hepatopancreas by immuno-gold-silver labeling." *Marine Environmental Research* **46**(1–5): 411-414.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(97\)00069-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(97)00069-X).
- Koutsogiannaki, S. and M. Kaloyianni (2010). "Signaling molecules involved in immune responses in mussels." *Invertebrate Survival Journal* **7**: 11-21.  
url: [www.isj.unimo.it/articoli/ISJ201.pdf](http://www.isj.unimo.it/articoli/ISJ201.pdf).
- Koutsogiannaki, S. and M. Kaloyianni (2011). "Effect of 17beta-estradiol on adhesion of *Mytilus galloprovincialis* hemocytes to selected substrates. Role of alpha2 integrin subunit." *Fish & Shellfish Immunology* **31**(1): 73-80.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2011.04.003>.
- Krarup, A., R. Wallis, J. S. Presanis, P. Gál and R. B. Sim (2007). "Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2." *PLoS ONE* **2**(7): e623.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000623>.
- Krause, M. S., L. P. Oliveira, Jr., E. M. Silveira, D. R. Vianna, J. S. Rossato, B. S. Almeida, M. F. Rodrigues, A. J. Fernandes, J. A. Costa, R. Curi and P. I. de Bittencourt, Jr. (2007). "MRP1/GS-X pump ATPase expression: is this the explanation for the cytoprotection of the heart against oxidative stress-induced redox imbalance in comparison to skeletal muscle cells?" *Cell Biochem Funct* **25**(1): 23-32.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.1343>.
- Kreisel, D., R. G. Nava, W. Li, B. H. Zinselmeyer, B. Wang, J. Lai, R. Pless, A. E. Gelman, A. S. Krupnick and M. J. Miller (2010). "In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(42): 18073-18078.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1008737107>.

- Kubota, Y., Y. Watanabe, H. Otsuka, T. Tamiya, T. Tsuchiya and J. J. Matsumoto (1985). "Purification and characterization of an antibacterial factor from snail mucus." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology **82**(2): 345-348.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413\(85\)90173-2](http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413(85)90173-2).
- Kumar, V., A. K. Abbas, N. Fausto and R. Mitchell (2012). Robbins Basic Pathology, Elsevier Health Sciences.
- Kumazawa, N. H. and N. Morimoto (1992). "Chemotactic activity of hemocytes derived from a brackish-water clam, *Corbicula japonica*, to *Vibrio parahaemolyticus* and *Escherichia coli* strains." Journal of Veterinary Medical Science **54**(5): 851-855.  
url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1420564>.
- Kurelec, B. (1992). "The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms." Critical Reviews in Toxicology **22**(1): 23-43.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/10408449209145320>.
- Kurelec, B. (1995a). "Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: ecotoxic consequences." Science of The Total Environment **171**(1-3): 197-204.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04689-4](http://dx.doi.org/10.1016/0048-9697(95)04689-4).
- Kurelec, B. (1995b). "Reversion of the multixenobiotic resistance mechanism in gills of a marine mussel *Mytilus galloprovincialis* by a model inhibitor and environmental modulators of P170-glycoprotein." Aquatic Toxicology **33**(2): 93-103.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X\(95\)00010-2](http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X(95)00010-2).
- Kurelec, B. (1997). "A new type of hazardous chemical: the chemosensitizers of multixenobiotic resistance." Environmental Health Perspectives **105 Suppl 4**: 855-860.  
url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1470033/>.
- Kurelec, B., S. Krča and D. Lucić (1996). "Expression of multixenobiotic resistance mechanism in a marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of exposure to polluted environments." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology **113**(2): 283-289.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413\(96\)84525-7](http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413(96)84525-7).
- Kurelec, B., S. Krca, B. Pivcevic, D. Ugarkovic, M. Bachmann, G. Imsiecke and W. E. Muller (1992). "Expression of P-glycoprotein gene in marine sponges. Identification and characterization of the 125 kDa drug-binding glycoprotein." Carcinogenesis **13**(1): 69-76.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/13.1.69>.
- Kurelec, B. and B. Pivčević (1989). "Distinct glutathione-dependent enzyme activities and a verapamil-sensitive binding of xenobiotics in a fresh-water mussel *Anodonta cygnea*." Biochemical and Biophysical Research Communications **164**(2): 934-940.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)91548-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(89)91548-9).
- Kurelec, B. and B. Pivčević (1991). "Evidence for a multixenobiotic resistance mechanism in the mussel *Mytilus galloprovincialis*." Aquatic Toxicology **19**(4): 291-301.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X\(91\)90054-D](http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X(91)90054-D).
- Kurelec, B., P. Waldmann and R. K. Zahn (1996). "The modulation of protective effects of the multixenobiotic resistance mechanism in a clam *Corbicula fluminea*." Marine Environmental Research **42**(1-4): 383-387.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136\(96\)87092-9](http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136(96)87092-9).
- Kurn, U., F. Sommer, G. Hemmrich, T. C. Bosch and K. Khalturin (2007). "Allorecognition in urochordates: identification of a highly variable complement receptor-like protein expressed in follicle cells of *Ciona*." Developmental & Comparative Immunology **31**(4): 360-371.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2006.06.008>.
- Kurtz, J. (2004). "Memory in the innate and adaptive immune systems." Microbes and Infection **6**(15): 1410-1417.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2004.10.002>.
- Kvell, K., E. L. Cooper, P. Engelmann, J. Bovari and P. Nemeth (2007). "Blurring borders: innate immunity with adaptive features." Clinical and Developmental Immunology **2007**: 83671.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2007/83671>.
- Labreuche, Y., C. Lambert, P. Soudant, V. Boulo, A. Huvet and J.-L. Nicolas (2006). "Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32." Microbes and Infection **8**(12-13): 2715-2724.

- DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2006.07.020>.
- Lacoste, A., F. Jalabert, S. Malham, A. Cueff, F. Gelebart, C. Cordevant, M. Lange and S. A. Poulet (2001). "A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France)." *Dis Aquat Organ* **46**(2): 139-145.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3354/dao046139>.
- Lammermann, T. and M. Sixt (2009). "Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration." *Current Opinion in Cell Biology* **21**(5): 636-644.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2009.05.003>.
- Landsteiner, K. P. L. (1945). *The specificity of serological reactions*. Cambridge, Mass., Harvard Univ. Press.
- Langley, S. D., S. D. Wilson, A. S. Gross, C. K. Warner and V. Finnerty (1983). "A genetic variant of beta-glucuronidase in *Drosophila melanogaster*." *Journal of Biological Chemistry* **258**(12): 7416-7424.  
url: <http://www.jbc.org/content/258/12/7416.abstract>.
- Lania-Pietrzak, B., K. Michalak, A. B. Hendrich, D. Mosiądz, G. Gryniewicz, N. Motohashi and Y. Shirataki (2005). "Modulation of MRP1 protein transport by plant, and synthetically modified flavonoids." *Life Sciences* **77**(15): 1879-1891.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2005.04.005>.
- Laskowski, M., Jr. and I. Kato (1980). "Protein inhibitors of proteinases." *Annual Review of Biochemistry* **49**: 593-626.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.49.070180.003113>.
- Lata, S. and G. Raghava (2008). "PRRDB: A comprehensive database of Pattern-Recognition Receptors and their ligands." *BMC Genomics* **9**(1): 180.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-180>.
- Lauffenburger, D. A. and A. F. Horwitz (1996). "Cell Migration: a physically integrated molecular process." *Cell* **84**(3): 359-369.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81280-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81280-5).
- Laval-Gilly, P., J. Falla, D. Klestadt and M. Henryon (2000). "A new approach to evaluate toxicity of gases on mobile cells in culture." *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **44**(3): 483-488.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1056-8719\(01\)00114-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1056-8719(01)00114-9).
- Lavine, M. D. and M. R. Strand (2002). "Insect hemocytes and their role in immunity." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**(10): 1295-1309.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9).
- Lawson, M. A. and F. R. Maxfield (1995). "Ca(2+)- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils." *Nature* **377**(6544): 75-79.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/377075a0>.
- Le Bris, H. and H. Pouliquen (2004). "Experimental study on the bioaccumulation of oxytetracycline and oxolinic acid by the blue mussel (*Mytilus edulis*). An evaluation of its ability to bio-monitor antibiotics in the marine environment." *Marine Pollution Bulletin* **48**(5-6): 434-440.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2003.08.018>.
- Le, Y., Y. Zhou, P. Iribarren and J. Wang (2004). "Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease." *Cellular & Molecular Immunology* **1**(2): 95-104.  
url: <http://www.cmi.ustc.edu.cn/1/2/95.pdf>.
- Leah M. Oliver and W. S. Fisher (1999). "Appraisal of prospective bivalve immunomarkers." *Biomarkers* **4**(6): 510-530.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/135475099230679>.
- Lebedeva, I. V., P. Pande and W. F. Patton (2011). "Sensitive and specific fluorescent probes for functional analysis of the three major types of mammalian ABC transporters." *PLoS ONE* **6**(7): e22429.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022429>.
- Lecointre, G. and M. L. Bonnet (2008). *Comprendre et enseigner la classification du vivant*, Belin.
- Lecointre, G., H. L. Guyader and D. Visset (2006). *Classification phylogénétique du vivant*, Belin.
- Lee, S., Z. Shen, D. N. Robinson, S. Briggs and R. A. Firtel (2010). "Involvement of the cytoskeleton in controlling leading-edge function during chemotaxis." *Molecular Biology of the Cell* **21**(11): 1810-1824.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E10-01-0009>.

- Lee, W. L., R. E. Harrison and S. Grinstein (2003). "Phagocytosis by neutrophils." Microbes and Infection **5**(14): 1299-1306.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.014>.
- Legrand, O., G. Simonin, J. Y. Perrot, R. Zittoun and J. P. Marie (1998). "Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients." Blood **91**(12): 4480-4488.  
url: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/91/12/4480.long>.
- Lemaire, N., J. Pellerin, M. Fournier, L. Girault, E. Tamigneaux, S. Cartier and E. Pelletier (2006). "Seasonal variations of physiological parameters in the blue mussel *Mytilus spp.* from farm sites of eastern Quebec." Aquaculture **261**(2): 729-751.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.017>.
- Lemaitre, B. and J. Hoffmann (2007). "The host defense of *Drosophila melanogaster*." Annual Review of Immunology **25**: 697-743.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." Cell **86**(6): 973-983.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80172-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80172-5).
- Lemaitre, B., J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann (1997). "*Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(26): 14614-14619.  
url: <http://www.pnas.org/content/94/26/14614.long>.
- Leslie, E. M., R. G. Deeley and S. P. C. Cole (2005). "Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense." Toxicology and Applied Pharmacology **204**(3): 216-237.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.012>.
- Letendre, J., B. Chouquet, H. Manduzio, M. Marin, F. Bultelle, F. Leboulenger and D. Durand (2009). "Tidal height influences the levels of enzymatic antioxidant defences in *Mytilus edulis*." Marine Environmental Research **67**: 69-74.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.11.003>.
- Levin, J. and F. B. Bang (1964). "The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood." Bull Johns Hopkins Hosp **115**: 265-274.  
url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14209047>.
- Lhafi, S. K. and M. Kuhne (2007). "Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea." Int J Food Microbiol **116**(2): 297-300.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.007>.
- Li, H., M. G. Parisi, M. Toubiana, M. Cammarata and P. Roch (2008). "Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses." Fish & Shellfish Immunology **25**(1-2): 143-152.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2008.04.001>.
- Litman, T., T. E. Druley, W. D. Stein and S. E. Bates (2001). "From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance." Cellular and Molecular Life Sciences **58**(7): 931-959.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/PL00000912>.
- Little, T. J., B. O'Connor, N. Colegrave, K. Watt and A. F. Read (2003). "Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate." Current Biology **13**(6): 489-492.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00163-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00163-5).
- Liu, H., P. Jiravanichpaisal, L. Cerenius, B. L. Lee, I. Soderhall and K. Soderhall (2007). "Phenoloxidase is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*." The Journal of Biological Chemistry **282**(46): 33593-33598.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M706113200>.
- Livingstone, D. R., J. K. Chipman, D. M. Lowe, C. Minier and R. K. Pipe (2000). "Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids." International Journal of Environment and Pollution **13**(1): 56-91.  
url: <http://inderscience.metapress.com/content/33UWTM3U412F737R>.

- Lohoff, M., S. Pechtl, F. Sommer, M. Roellinghoff, E. Schmitt, G. Gradehandt, P. Rohwer, B. D. Stride, S. P. Cole and R. G. Deeley (1998). "A multidrug-resistance protein (MRP)-like transmembrane pump is highly expressed by resting murine T helper (Th) 2, but not Th1 cells, and is induced to equal expression levels in Th1 and Th2 cells after antigenic stimulation in vivo." The Journal of Clinical Investigation **101**(3): 703-710.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1172/jci824>.
- Loker, E. S., C. M. Adema, S. M. Zhang and T. B. Kepler (2004). "Invertebrate immune systems--not homogeneous, not simple, not well understood." Immunological Reviews **198**: 10-24.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.01117.x>.
- Lopez-Cortes, L., D. Castro, J. I. Navas and J. J. Borrego (1999). "Phagocytic and chemotactic responses of manila and carpet shell clam haemocytes against *Vibrio tapetis*, the causative agent of brown ring disease." Fish & Shellfish Immunology **9**(7): 543-555.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/fsim.1999.0211>.
- Lopez-Otin, C. and J. S. Bond (2008). "Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease." Journal of Biological Chemistry **283**(45): 30433-30437.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R800035200>.
- Lopez, C., Carballal, M. J., Azevedo, Villalba and A. (1997). "Differential phagocytic ability of the circulating haemocyte types of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia)." Dis Aquat Organ **30**(3): 209-215.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3354/dao030209>.
- Luckenbach, T., R. Altenburger and D. Epel (2008). "Teasing apart activities of different types of ABC efflux pumps in bivalve gills using the concepts of independent action and concentration addition." Marine Environmental Research **66**(1): 75-76.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.02.027>.
- Luckenbach, T. and D. Epel (2005). "Nitromusk and polycyclic musk compounds as long-term inhibitors of cellular xenobiotic defense systems mediated by multidrug transporters." Environmental Health Perspectives **113**(1): 17-24.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.7301>.
- Luckenbach, T. and D. Epel (2008). "ABC- and ABCC-type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills." American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **294**(6): R1919-1929.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00563.2007>.
- Lüdeking, A. and A. Köhler (2002). "Identification of six mRNA sequences of genes related to multixenobiotic resistance(MXR) and biotransformation in *Mytilus edulis*." Marine ecology-progress series **238**: 115-124.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3354/meps238115>.
- Ludeking, A., C. J. Van Noorden and A. Koehler (2005). "Identification and characterisation of a multidrug resistance-related protein mRNA in the blue mussel *Mytilus edulis*." Marine Ecology Progress Series **286**: 167-175.  
url: <http://www.int-res.com/articles/meps2005/286/m286p167.pdf>.
- Luedeking, A. and A. Koehler (2004). "Regulation of expression of multixenobiotic resistance (MXR) genes by environmental factors in the blue mussel *Mytilus edulis*." Aquatic Toxicology **69**(1): 1-10.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.003>.
- Luna-Gonzalez, A., A. N. Maeda-Martinez, F. Vargas-Albores, F. Ascencio-Valle and M. Robles-Mungaray (2003). "Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs." Fish & Shellfish Immunology **15**(4): 275-282.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1050-4648\(02\)00165-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1050-4648(02)00165-1).
- Luster, A. D. (2001). "Chemotaxis: role in immune response." eLS.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/npg.els.0000507>.
- Lutz, R. A. (1978). "Pearl incidence in *Mytilus edulis* L. and its commercial raft cultivation implications." Proceedings of the annual meeting - World Mariculture Society **9**(1-4): 507-522.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-7345.1978.tb00270.x>.

- Luu, N. T., G. E. Rainger and G. B. Nash (2000). "Differential ability of exogenous chemotactic agents to disrupt transendothelial migration of flowing neutrophils." The Journal of Immunology **164**(11): 5961-5969.  
url: <http://www.jimmunol.org/content/164/11/5961.abstract>.
- Magazine, H. I., Y. Liu, T. V. Bilfinger, G. L. Fricchione and G. B. Stefano (1996). "Morphine-induced conformational changes in human monocytes, granulocytes, and endothelial cells and in invertebrate immunocytes and microglia are mediated by nitric oxide." Journal of Immunology **156**(12): 4845-4850.  
url: <http://www.jimmunol.org/content/156/12/4845.long>.
- Malagoli, D. (2010). "Cytokine network in invertebrates: the very next phase of comparative immunology." Invertebrate Survival Journal **7**: 146-148.  
url: [www.isj.unimo.it/articoli/ISJ214.pdf](http://www.isj.unimo.it/articoli/ISJ214.pdf).
- Malagoli, D., L. Casarini and E. Ottaviani (2008). "Effects of the marine toxins okadaic acid and palytoxin on mussel phagocytosis." Fish & Shellfish Immunology **24**(2): 180-186.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2007.10.012>.
- Malagoli, D., L. Casarini, S. Sacchi and E. Ottaviani (2007). "Stress and immune response in the mussel *Mytilus galloprovincialis*." Fish & Shellfish Immunology **23**(1): 171-177.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2006.10.004>.
- Male, D. K. (2006). Immunology, Mosby.
- Mañes, S., C. Gómez-Moutón, R. A. Lacalle, S. Jiménez-Baranda, E. Mira and C. Martínez-A (2005). "Mastering time and space: immune cell polarization and chemotaxis." Seminars in Immunology **17**(1): 77-86.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2004.09.005>.
- Mangelsdorf, D. J. and R. M. Evans (1995). "The RXR heterodimers and orphan receptors." Cell **83**(6): 841-850.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90200-7](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(95)90200-7).
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schütz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon and R. M. Evans (1995). "The nuclear receptor superfamily: The second decade." Cell **83**(6): 835-839.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90199-X](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(95)90199-X).
- Marin, M. (2005). **Thèse**: Xénobiotiques et détoxication cellulaire : couplage d'un mécanisme de détoxication cellulaire de type MDR/MXR à des courants chlorures osmorégulés, Université du Havre.
- Marin, M., H. Legros, A. Poret, F. Le Boulenger and F. Le Foll (2004). "Cell responses to xenobiotics: comparison of MCF7 multi-drug- and mussel blood cell multi-xenobiotic-defense mechanisms." Marine Environmental Research **58**(2-5): 209-213.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.016>.
- Marquardt, D., S. McCrone and M. S. Center (1990). "Mechanisms of multidrug resistance in HL60 cells: detection of resistance-associated proteins with antibodies against synthetic peptides that correspond to the deduced sequence of P-Glycoprotein." Cancer Res **50**(5): 1426-1430.  
url: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/50/5/1426.abstract>.
- Marques, M. R. F. and M. A. Barracco (2000). "Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans." Aquaculture **191**(1-3): 23-44.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00417-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00417-8).
- Masschalck, B. and C. W. Michiels (2003). "Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria." Critical Reviews in Microbiology **29**(3): 191-214.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/713610448>.
- Mast, S. O. (1942). "The hydrogen ion concentration of the content of the food vacuoles and the cytoplasm in amoeba and other phenomena concerning the food vacuoles." The Biological Bulletin **83**(2): 173-204.  
url: <http://www.biobull.org/content/83/2/173.abstract>.
- Matozzo, V., A. Chinellato, M. Munari, L. Finos, M. Bressan and M. G. Marin (2012). "First evidence of immunomodulation in bivalves under seawater acidification and increased temperature." PLoS ONE **7**(3): e33820.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033820>.
- Matsushita, M., Y. Endo, S. Taira, Y. Sato, T. Fujita, N. Ichikawa, M. Nakata and T. Mizuochi (1996). "A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin." Journal of Biological Chemistry **271**(5): 2448-2454.

- DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.5.2448>.
- Matzinger, P. (2002). "The danger model: a renewed sense of self." *Science* **296**(5566): 301-305.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1071059>.
- McHenery, J. G. and T. H. Birkbeck (1985). "Uptake and processing of cultured microorganisms by bivalves." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **90**(2): 145-163.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981\(85\)90116-9](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(85)90116-9).
- McHenery, J. G., T. H. Birkbeck and J. A. Allen (1979). "The occurrence of lysozyme in marine bivalves." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **63**(1): 25-28.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491\(79\)90228-1](http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491(79)90228-1).
- McKerrow, J. H., C. Caffrey, B. Kelly, P. Loke and M. Sajid (2006). "Proteases in parasitic diseases." *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease* **1**: 497-536.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100151>.
- McNeil, P. L., L. Tanasugarn, J. B. Meigs and D. L. Taylor (1983). "Acidification of phagosomes is initiated before lysosomal enzyme activity is detected." *The Journal of Cell Biology* **97**(3): 692-702.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.97.3.692>.
- Medawar, P. B. (1961). "Immunological tolerance." *Nature* **189**: 14-17.  
url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13768821>.
- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." *Nature Reviews Immunology* **1**(2): 135-145.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/35100529>.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1998a). "Innate immune recognition and control of adaptive immune responses." *Seminars in Immunology* **10**(5): 351-353.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/smim.1998.0136>.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1998b). "Self-defense: the fruit fly style." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**(2): 429-430.  
url: <http://www.pnas.org/content/95/2/429.full>.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (2002). "Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system." *Science* **296**(5566): 298-300.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1068883>.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt and C. A. Janeway, Jr. (1997). "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity." *Nature* **388**(6640): 394-397.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/411131>.
- Meena, B., S. Rose, S. Jayaraj and S. Vincent (2010). "Encapsulation response from the hemocytes of estuarine clam *Meretrix casta*." *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences* **1**(3): 1-8.  
url: <http://www.ijpbs.net/issue-3/8.pdf>.
- Mejillano, M. R., S.-i. Kojima, D. A. Applewhite, F. B. Gertler, T. M. Svitkina and G. G. Borisy (2004). "Lamellipodial *versus* filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end." *Cell* **118**(3): 363-373.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.019>.
- Metchnikoff, E. (1908). On the present state of the question of immunity in infectious diseases. *Nobel lectures in medicine or physiology (1901-1921)*. Singapore, World Scientific Publishing Co. **1**: 281-300.
- Michel, K., A. Budd, S. Pinto, T. J. Gibson and F. C. Kafatos (2005). "Anopheles gambiae SRPN2 facilitates midgut invasion by the malaria parasite *Plasmodium berghei*." *European Molecular Biology Organization Reports* **6**(9): 891-897.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embor.7400478>.
- Mickley, L. A., B. A. Spengler, T. A. Knutsen, J. L. Biedler and T. Fojo (1997). "Gene rearrangement: a novel mechanism for MDR-1 gene activation." *Journal of Clinical Investigation* **99**(8): 1947-1957.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1172/jci119362>.
- Miki, Y., T. Suzuki, C. Tazawa, B. Blumberg and H. Sasano (2005). "Steroid and xenobiotic receptor (SXR), cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance gene 1 in human adult and fetal tissues." *Molecular and Cellular Endocrinology* **231**(1-2): 75-85.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2004.12.005>.
- Miller, J. F. (1961). "Analysis of the thymus influence in leukaemogenesis." *Nature* **191**: 248-249.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/191248a0>.

- Minier, C., F. Akcha and F. Galgani (1993). "P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater." Comparative Biochemistry and Physiology - Part B **106**(4): 1029-1036.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491\(93\)90068-G](http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491(93)90068-G).
- Minier, C., V. V. Borghi, M. N. Moore and C. Porte (2000). "Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*." Aquatic Toxicology **50**(3): 167-176.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00104-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00104-6).
- Minier, C. and F. Galgani (1995). "Multi-xenobiotic resistance in *Mytilus edulis*." Marine Environmental Research **39**(1-4): 267-270.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136\(94\)00056-U](http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136(94)00056-U).
- Minier, C., C. Lelong, N. Djemel, F. Rodet, R. Tutundjian, P. Favrel, M. Mathieu and F. Le Boulenger (2002). "Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*." Marine Environmental Research **54**(3-5): 455-459.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(02\)00195-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00195-2).
- Minier, C. and M. N. Moore (1996). "Induction of multixenobiotic resistance in mussel blood cells." Marine Environmental Research **42**(1-4): 389-392.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136\(96\)87093-0](http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136(96)87093-0).
- Minier, C. and M. N. Moore (1998). "Calcein accumulation in mussel blood cells." Marine Environmental Research **46**(1-5): 425-428.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(97\)00076-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(97)00076-7).
- Mitta, G., F. Hubert, T. Noel and P. Roch (1999). "Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*." European Journal of Biochemistry **265**(1): 71-78.  
DOI: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1432-1327.1999.00654.x/full>.
- Mitta, G., F. Vandenbulcke, F. Hubert and P. Roch (1999). "Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge." Journal of Cell Science **112**: 4233-4242.  
DOI: <http://jcs.biologists.org/content/112/23/4233.short>.
- Mitta, G., F. Vandenbulcke, F. Hubert, M. Salzet and P. Roch (2000a). "Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense." Journal of Biological Chemistry **275**(17): 12954-12962.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.17.12954>.
- Mitta, G., F. Vandenbulcke and P. Roch (2000b). "Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity." FEBS Letters **486**(3): 185-190.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02192-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02192-X).
- Miyazaki, Y., T. Nishida, H. Aoki and T. Samata (2010). "Expression of genes responsible for biomineralization of *Pinctada fucata* during development." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **155**(3): 241-248.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.11.009>.
- Mizutani, T., M. Masuda, E. Nakai, K. Furumiya, H. Togawa, Y. Nakamura, Y. Kawai, K. Nakahira, S. Shinkai and K. Takahashi (2008). "Genuine functions of P-glycoprotein (ABCB1)." Curr Drug Metab **9**(2): 167-174.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/138920008783571756>.
- Montagnani, C., J. C. Avarre, J. de Lorgeril, M. Quiquand, V. Boulo and J. M. Escoubas (2007). "First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of Pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway." Developmental & Comparative Immunology **31**(1): 1-11.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2006.04.002>.
- Montagnani, C., F. Le Roux, F. Berthe and J.-M. Escoubas (2001). "Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms." FEBS Letters **500**(1-2): 64-70.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02559-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02559-5).
- Moore, M. N. and D. M. Lowe (1977). "The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles." Journal of Invertebrate Pathology **29**(1): 18-30.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(77\)90167-7](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(77)90167-7).

- Moret, Y. (2006). "'Trans-generational immune priming': specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*." Proc Biol Sci **273**(1592): 1399-1405.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2006.3465>.
- Morey, M., M. Corominas and F. Serras (2003). "DIAP1 suppresses ROS-induced apoptosis caused by impairment of the selD/sps1 homolog in *Drosophila*." Journal of Cell Science **116**(22): 4597-4604.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00783>.
- Morita, M. and T. Imanaka (2012). "Peroxisomal ABC transporters: Structure, function and role in disease." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1822**(9): 1387-1396.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.02.009>.
- Mottin, E., C. Caplat, T. Latire, A. Mottier, M.-L. Mahaut, K. Costil, D. Barillier, J.-M. Lebel and A. Serpentine (2012). "Effect of zinc sacrificial anode degradation on the defence system of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Chronic and acute exposures." Marine Pollution Bulletin **64**(9): 1911-1920.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.06.017>.
- Mount, A. S., A. P. Wheeler, R. P. Paradkar and D. Snider (2004). "Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster." Science **304**(5668): 297-300.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1090506>.
- Munari, M., V. Matozzo and M. G. Marin (2011). "Combined effects of temperature and salinity on functional responses of haemocytes and survival in air of the clam *Ruditapes philippinarum*." Fish & Shellfish Immunology **30**(4-5): 1024-1030.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2011.01.025>.
- Museum, A. (2012, 12 June 2010). "Invertebrate biodiversity."  
from <http://australianmuseum.net.au/Invertebrate-biodiversity/>.
- Muta, T. and S. Iwanaga (1996). "The role of hemolymph coagulation in innate immunity." Current Opinion in Immunology **8**(1): 41-47.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0952-7915\(96\)80103-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0952-7915(96)80103-8).
- Nakatsukasa, H., J. A. Silverman, T. W. Gant, R. P. Evarts and S. S. Thorgeirsson (1993). "Expression of multidrug resistance genes in rat liver during regeneration and after carbon tetrachloride intoxication." Hepatology **18**(5): 1202-1207.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/hep.1840180528>.
- Nappi, A. J. and B. M. Christensen (2005). "Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity." Insect Biochemistry and Molecular Biology **35**(5): 443-459.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.01.014>.
- Nappi, A. J., E. Vass, F. Frey and Y. Carton (2000). "Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity." Nitric oxide : biology and chemistry **4**(4): 423-430.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/niox.2000.0294>.
- Navarro, A., S. Weißbach, M. Faria, C. Barata, B. Piña and T. Luckenbach (2012). "Abcb and Abcc transporter homologs are expressed and active in larvae and adults of zebra mussel and induced by chemical stress." Aquatic Toxicology **122-123**(0): 144-152.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.06.008>.
- Naviaux, R. K. (2012). "Oxidative shielding or oxidative stress?" J Pharmacol Exp Ther **342**(3): 608-618.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.112.192120>.
- Newell, R. I. E. (1989). Species profiles : life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (North and Mid-Atlantic) : blue mussel. Vicksburg, MS :, Coastal Ecology Group, Waterways Experiment Station, U.S. Army Corps of Engineer ;.
- Newton, K. and V. M. Dixit (2012). "Signaling in Innate Immunity and Inflammation." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **4**(3).  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006049>.
- Nigro, M., E. Orlando and F. Regoli (1992). "Ultrastructural localization of metal binding sites in the kidney of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*." Marine Biology **113**(4): 637-643.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00349707>.
- Nilsen, I. W., K. Overbo, E. Sandsdalen, E. Sandaker, K. Sletten and B. Myrnes (1999). "Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity." FEBS Letters **464**(3): 153-158.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01693-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01693-2).

- Nonaka, M. (2011). "The complement C3 protein family in invertebrates." Invertebrate Survival Journal **8**: 21-32.  
url: <http://www.isj.unimo.it/articoli/ISJ229.pdf>.
- Norcross, M. A. (1984). "A synaptic basis for T-lymphocyte activation." Annual Review of Immunology **13**(2): 113-134.  
url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2551763/>.
- Novas, A., R. Barcia and J. I. Ramos-Martinez (2007). "After the Prestige oil spill modifications in NO production and other parameters related to the immune response were detected in hemocytes of *Mytilus galloprovincialis*." Aquatic Toxicology **85**(4): 285-290.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.09.011>.
- Novas, A., A. Cao, R. Barcia and J. I. Ramos-Martinez (2004). "Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide." International Journal of Biochemistry & Cell Biology **36**(3): 390-394.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00212-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00212-7).
- Nyholm, S. V., E. Passegue, W. B. Ludington, A. Voskoboynik, K. Mitchel, I. L. Weissman and A. W. De Tomaso (2006). "fester, A candidate allorecognition receptor from a primitive chordate." Immunity **25**(1): 163-173.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2006.04.011>.
- Oez, S., E. Platzer and K. Welte (1990). "A quantitative colorimetric method to evaluate the functional state of human polymorphonuclear leukocytes." Blut **60**(2): 97-102.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01720515>.
- Oez, S., K. Welte, E. Platzer and J. R. Kalden (1990). "A simple assay for quantifying the inducible adherence of neutrophils." Immunobiology **180**(4-5): 308-315.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0171-2985\(11\)80294-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0171-2985(11)80294-9).
- Olafsen, J. A. (1986). Invertebrate lectins: biochemical heterogeneity as a possible key to their biological function. Immunity in Invertebrates. M. Brehélin, Springer Berlin Heidelberg: 94-111.
- Olafsen, J. A. (1995). "Role of lectins (C-reactive protein) in defense of marine bivalves against bacteria." Advances in experimental medicine and biology **371A**: 343-348.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-1941-6\\_72](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-1941-6_72).
- Olsen, O. M., I. W. Nilsen, K. Sletten and B. Myrnes (2003). "Multiple invertebrate lysozymes in blue mussel (*Mytilus edulis*)." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **136**(1): 107-115.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00174-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00174-X).
- Ottaviani, E., A. Franchini, D. Malagoli and S. Genedani (2000). "Immunomodulation by recombinant human interleukin-8 and its signal transduction pathways in invertebrate hemocytes." Cellular and Molecular Life Sciences **57**(3): 506-513.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/PL00000711>.
- Ottaviani, E., L. R. Paeman, P. Cadet and G. B. Stefano (1993). "Evidence for nitric oxide production and utilization as a bacteriocidal agent by invertebrate immunocytes." European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology **248**(4): 319-324.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0926-6917\(93\)90006-C](http://dx.doi.org/10.1016/0926-6917(93)90006-C).
- Oubella, R., P. Maes, C. Paillard and M. Auffret (1993). "Experimentally induced variation in hemocyte density for *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus* (Mollusca, Bivalvia)." Dis Aquat Organ **15**(3): 193-197.  
url: <http://www.univ-brest.fr/IUEM/UMR6539/publications/paillard/Oubella%201993.pdf>.
- Oude Elferink, R. P. J. and A. K. Groen (1995). "The role of mdr2 P-glycoprotein in biliary lipid secretion. Cross-talk between cancer research and biliary physiology." J Hepatol **23**(5): 617-625.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0168-8278\(95\)80071-9](http://dx.doi.org/10.1016/0168-8278(95)80071-9).
- Pain, S. (2003). **Thèse**: Potentiel biomarqueur du mécanisme de défense multixénobiotique (MDMX) chez *Dreissena polymorpha* pour le suivi de la pollution organique en eaux douces, Metz
- Pain, S. and M. Parant (2007). "Identification of multixenobiotic defence mechanism (MXR) background activities in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* as reference values for its use as biomarker in contaminated ecosystems." Chemosphere **67**(6): 1258-1263.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.11.017>.

- Palecek, S. P., A. Huttenlocher, A. F. Horwitz and D. A. Lauffenburger (1998). "Physical and biochemical regulation of integrin release during rear detachment of migrating cells." *Journal of Cell Science* **111** ( Pt 7): 929-940.  
url: <http://jcs.biologists.org/content/111/7/929.full.pdf>.
- Pallavicini, A., M. Costa Mdel, C. Gestal, R. Dreos, A. Figueras, P. Venier and B. Novoa (2008). "High sequence variability of myticin transcripts in hemocytes of immune-stimulated mussels suggests ancient host-pathogen interactions." *Developmental & Comparative Immunology* **32**(3): 213-226.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2007.05.008>.
- Paluch, E., M. Piel, J. Prost, M. Bornens and C. Sykes (2005). "Cortical actomyosin breakage triggers shape oscillations in cells and cell fragments." *Biophysical Journal* **89**(1): 724-733.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.105.060590>.
- Parant, M. and S. Pain (2001). "Potential use of multixenobiotic defense mechanism (mxdm) in *Dreissena polymorpha* as a biomarker for the monitoring of freshwater pollution." *Water Research* **35**(15): 3743-3748.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00074-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00074-4).
- Parent, C. A. (2004). "Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and *Dictyostelium*." *Current Opinion in Cell Biology* **16**(1): 4-13.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2003.11.008>.
- Paris, I. o. d. (2012). *Immunité Innée. de la découverte révolutionnaire à la révolution thérapeutique*, Insitut océanographique de Paris, Dossier de presse.
- Parisi, M. G., H. Li, L. B. Jovet, E. A. Dyrinda, N. Parrinello, M. Cammarata and P. Roch (2008). "Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria." *Fish & Shellfish Immunology* **25**(6): 834-840.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2008.09.005>.
- Park, J. W., C. H. Kim, J. H. Kim, B. R. Je, K. B. Roh, S. J. Kim, H. H. Lee, J. H. Ryu, J. H. Lim, B. H. Oh, W. J. Lee, N. C. Ha and B. L. Lee (2007). "Clustering of peptidoglycan recognition protein-SA is required for sensing lysine-type peptidoglycan in insects." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(16): 6602-6607.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0610924104>.
- Parsons, J. T., A. R. Horwitz and M. A. Schwartz (2010). "Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension." *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**(9): 633-643.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2957>.
- Partridge, T. and P. S. Davies (1974). "Limpet haemocytes. II. The role of spikes in locomotion and spreading." *Journal of Cell Science* **14**(2): 319-330.  
url: <http://jcs.biologists.org/content/14/2/319.long>.
- Partridge, T., G. E. Jones and R. Gillett (1975). "Cytochalasin B inhibits stabilisation of adhesions in fast-aggregating cell systems." *Nature* **253**(5493): 632-634.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/253632a0>.
- Pasquier, J. (2011). **Thèse**: Mécanismes de résistance multidrogue par transfert extragénétique de la P-glycoprotéine et modulation du volume cellulaire. PhD, Université du Havre.
- Pasquier, J., L. Galas, C. Boulange-Lecomte, D. Rioult, F. Bultelle, P. Magal, G. Webb and F. Le Foll (2012). "Different modalities of intercellular membrane exchanges mediate cell-to-cell p-glycoprotein transfers in MCF-7 breast cancer cells." *The Journal of Biological Chemistry* **287**(10): 7374-7387.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.312157>.
- Patel, S. V. (2004). A novel function of invertebrate collagen in the biomineralization process during the shell repair of eastern oyster, *Crassostrea virginica*, Clemson University.
- Pellegrin, S. and H. Mellor (2007). "Actin stress fibres." *Journal of Cell Science* **120**(20): 3491-3499.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.018473>.
- Petersen, J. M., F. U. Zielinski, T. Pape, R. Seifert, C. Moraru, R. Amann, S. Hourdez, P. R. Girguis, S. D. Wankel, V. Barbe, E. Pelletier, D. Fink, C. Borowski, W. Bach and N. Dubilier (2011). "Hydrogen is an energy source for hydrothermal vent symbioses." *Nature* **476**(7359): 176-180.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10325>.

- Philipp, E. E. R., L. Kraemer, F. Melzner, A. J. Poustka, S. Thieme, U. Findeisen, S. Schreiber and P. Rosenstiel (2012). "Massively parallel RNA sequencing identifies a complex immune gene repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*." PLoS ONE **7**(3): e33091.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033091>.
- Pipe, R. K. (1990). "Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*." Histochemical Journal **22**(11): 595-603.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01072941>.
- Pipe, R. K., S. R. Farley and J. A. Coles (1997). "The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*." Cell and Tissue Research **289**(3): 537-545.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s004410050899>.
- Pletjushkina, O. J., Z. Rajfur, P. Pomorski, T. N. Oliver, J. M. Vasiliev and K. A. Jacobson (2001). "Induction of cortical oscillations in spreading cells by depolymerization of microtubules." Cell Motility and the Cytoskeleton **48**(4): 235-244.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cm.1012>.
- Pollard, T. D. and G. G. Borisy (2003). "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments." Cell **112**(4): 453-465.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00120-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00120-X).
- Porter, R. R. (1973). "Structural studies of immunoglobulins." Science **180**(4087): 713-716.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.180.4087.713>.
- Portugal, J. and M. J. Waring (1988). "Assignment of DNA binding sites for 4',6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). A comparative footprinting study." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression **949**(2): 158-168.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0167-4781\(88\)90079-6](http://dx.doi.org/10.1016/0167-4781(88)90079-6).
- Prado-Alvarez, M., J. Rotllant, C. Gestal, B. Novoa and A. Figueras (2009). "Characterization of a C3 and a factor B-like in the carpet-shell clam, *Ruditapes decussatus*." Fish & Shellfish Immunology **26**(2): 305-315.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2008.11.015>.
- Prevodnik, A., J. Gardestrom, K. Lilja, T. Elfving, B. McDonagh, N. Petrovic, M. Tedengren, D. Sheehan and T. Bollner (2007). "Oxidative stress in response to xenobiotics in the blue mussel *Mytilus edulis* L.: evidence for variation along a natural salinity gradient of the Baltic Sea." Aquatic Toxicology **82**(1): 63-71.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.01.006>.
- Pruzzo, C., G. Gallo and L. Canesi (2005). "Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components." Environmental Microbiology **7**(6): 761-772.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00792.x>.
- Quinn, B., M. J. Costello, G. Dorange, J. G. Wilson and C. Mothersill (2009). "Development of an in vitro culture method for cells and tissues from the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*)." Cytotechnology **59**(2): 121-134.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10616-009-9202-3>.
- Quinn, M. T. and K. A. Gauss (2004). "Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases." Journal of Leukocyte Biology **76**(4): 760-781.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0404216>.
- Raftos, D. A., D. A. Briscoe and N. N. Tait (1988). "The mode of recognition of allogeneic tissue in the solitary urochordate *Styela plicata*." Transplantation **45**(6): 1123-1125.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00007890-198806000-00025>.
- Raggers, R. J., A. van Helvoort, R. Evers and G. van Meer (1999). "The human multidrug resistance protein MRP1 translocates sphingolipid analogs across the plasma membrane." Journal of Cell Science **112**(3): 415-422.  
url: <http://jcs.biologists.org/content/112/3/415.abstract>.
- Raingard, D., E. Bilbao, I. Cancio and M. P. Cajaraville (2013). "Retinoid X receptor (RXR), estrogen receptor (ER) and other nuclear receptors in tissues of the mussel *Mytilus galloprovincialis*: Cloning and transcription pattern." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **165**(2): 178-190.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.03.001>.

- Ramachandra, M., S. V. Ambudkar, D. Chen, C. A. Hrycyna, S. Dey, M. M. Gottesman and I. Pastan (1998). "Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state." Biochemistry **37**(14): 5010-5019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/bi973045u>.
- Ramon, G. (1955). "[The principle of adjuvant and stimulant substances of immunity; its bases; its applications]." C R Hebd Seances Acad Sci **241**(13): 781-784.  
url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13261360>.
- Randolph, G. J., S. Beaulieu, M. Pope, I. Sugawara, L. Hoffman, R. M. Steinman and W. A. Muller (1998). "A physiologic function for p-glycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(12): 6924-6929.  
url: <http://www.pnas.org/content/95/12/6924.long>.
- Ratcliffe, N. A. and A. F. Rowley (1981). Invertebrate Blood Cells: General aspects, animals without true circulatory systems to cephalopods. London UK, Academic Press.
- Raviv, Y., H. B. Pollard, E. P. Bruggemann, I. Pastan and M. M. Gottesman (1990). "Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells." Journal of Biological Chemistry **265**(7): 3975-3980.  
url: <http://www.jbc.org/content/265/7/3975.abstract>.
- Rebelo, M. d. F., E. d. S. Figueiredo, R. M. Mariante, A. Nóbrega, C. M. de Barros and S. Allodi (2013). "New Insights from the Oyster *Crassostrea rhizophorae* on Bivalve Circulating Hemocytes." PLoS ONE **8**(2): e57384.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057384>.
- Rego, R. O. M., O. Hajdušek, V. Kovář, P. Kopáček, L. Grubhoffer and V. Hypša (2005). "Molecular cloning and comparative analysis of fibrinogen-related proteins from the soft tick *Ornithodoros moubata* and the hard tick *Ixodes ricinus*." Insect Biochemistry and Molecular Biology **35**(9): 991-1004.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.04.001>.
- Renwantz, L., J. Daniels and P. D. Hansen (1985). "Lectin-binding to hemocytes of *Mytilus edulis*." Developmental & Comparative Immunology **9**(2): 203-210.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0145-305X\(85\)90111-9](http://dx.doi.org/10.1016/0145-305X(85)90111-9).
- Renwantz, L. and A. Stahmer (1983). "Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis*." Journal of comparative physiology **149**(4): 535-546.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00690013>.
- Revillard, J. P. (2001). Immunologie, De Boeck Supérieur.
- Ribeiro, C. and M. Brehélin (2006). "Insect haemocytes: What type of cell is that?" Journal of Insect Physiology **52**(5): 417-429.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.01.005>.
- Richards, E. and L. Renwantz (1991). "Two lectins on the surface of *Helix pomatia* haemocytes: a Ca<sup>2+</sup>-dependent, GalNAc-specific lectin and a Ca<sup>2+</sup>-independent, mannose 6-phosphate-specific lectin which recognises activated homologous opsonins." Journal of Comparative Physiology B **161**(1): 43-54.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00258745>.
- Richardson, D. L., D. S. Pepper and A. B. Kay (1976). "Chemotaxis for human monocytes by fibrinogen-derived peptides." Br J Haematol **32**(4): 507-513.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.1976.tb00953.x>.
- Ridley, Anne J. (2011). "Life at the Leading Edge." Cell **145**(7): 1012-1022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.010>.
- Rivett, A. J. and A. R. Hearn (2004). "Proteasome function in antigen presentation: immunoproteasome complexes, Peptide production, and interactions with viral proteins." Current protein & peptide science **5**(3): 153-161.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1389203043379774>.
- Robbiani, D. F., R. A. Finch, D. Jäger, W. A. Muller, A. C. Sartorelli and G. J. Randolph (2000). "The leukotriene C4 transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3 $\beta$ , ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes." Cell **103**(5): 757-768.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00179-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00179-3).

- Robert, J. (2010). "Comparative study of tumorigenesis and tumor immunity in invertebrates and nonmammalian vertebrates." Developmental & Comparative Immunology **34**(9): 915-925.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2010.05.011>.
- Robert, S., O. Le Moine and J. Prou (2003). Expertise des élevages de moules après la canicule estivale : rapport préliminaire.  
url: <http://archimer.ifremer.fr/doc/00074/18511/>.
- Robert, S., P. Soletchnik, O. Le Moine and S. Zanker (2007). Bilan d'étude sur la croissance de la moule (*Mytilus edulis*) sur bouchots et filières dans les Pertuis Charentais entre 2000 et 2005 (Réseau REMOULA).  
url: <http://archimer.ifremer.fr/doc/00084/19487/>.
- Roch, P. (1999). "Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates." Aquaculture **172**(1-2): 125-145.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00439-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00439-6).
- Roger, D. and T. Stossel (1950s). Chemotaxis: Crawling Neutrophil Chasing a Bacterium.  
url: <http://astro.temple.edu/~jbs/courses/204lectures/neutrophil-js.html>  
[http://www.youtube.com/watch?v=I\\_xh-bkiv\\_c](http://www.youtube.com/watch?v=I_xh-bkiv_c).
- Romero, A., S. Dios, L. Poisa-Beiro, M. M. Costa, D. Posada, A. Figueras and B. Novoa (2011). "Individual sequence variability and functional activities of fibrinogen-related proteins (FREPs) in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) suggest ancient and complex immune recognition models in invertebrates." Developmental & Comparative Immunology **35**(3): 334-344.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2010.10.007>.
- Rommel, C., M. Camps and H. Ji (2007). "PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond?" Nature Reviews Immunology **7**(3): 191-201.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2036>.
- Rowley, A. F. (1996). "The evolution of inflammatory mediators." Mediators of Inflammation **5**(1): 3-13.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/s0962935196000014>.
- Rowley, A. F. and A. Powell (2007). "Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific?" The Journal of Immunology **179**(11): 7209-7214.  
url: <http://www.jimmunol.org/content/179/11/7209.full>.
- Saito, T., S.-i. Kawabata, T. Shigenaga, Y. Takayenoki, J. Cho, H. Nakajima, M. Hirata and S. Iwanaga (1995). "A novel Big Defensin identified in horseshoe crab hemocytes: isolation, amino acid sequence, and antibacterial activity." Journal of Biochemistry **117**(5): 1131-1137.  
url: <http://jb.oxfordjournals.org/content/117/5/1131.abstract>.
- Saito, Y., E. Hirose and H. Watanabe (1994). "Allorecognition in compound ascidians." Int J Dev Biol **38**(2): 237-247.  
url: <http://www.ijdb.ehu.es/web/paper.php?doi=7981033>.
- Salbreux, G., J. F. Joanny, J. Prost and P. Pullarkat (2007). "Shape oscillations of non-adhering fibroblast cells." Physical Biology **4**(4): 268.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1088/1478-3975/4/4/004>.
- Salton, M. R. (1957). "The properties of lysozyme and its action on microorganisms." Bacteriol Rev **21**(2): 82-100.  
url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC180888/>.
- Salzet, M. (2001). "Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses." Trends Immunology **22**(6): 285-288.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)01895-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906(01)01895-6).
- Salzet, M., A. Tasiemski and E. Cooper (2006). "Innate immunity in lophotrochozoans: the annelids." Current Pharmaceutical Design **12**(24): 3043-3050.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/138161206777947551>.
- Samain, J. F. and H. McCombie (2008). Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*: The Moresst project, Éditions Quae.
- Santarem, M., J. A. Robledo and A. Figueras (1994). "Seasonal changes in hemocytes and serum defense factors in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*." Dis Aquat Organ **18**: 217-222.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3354/dao018217>.

- Sauve, S., P. Brousseau, J. Pellerin, Y. Morin, L. Senecal, P. Goudreau and M. Fournier (2002). "Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn)." Aquatic Toxicology **58**(3-4): 189-200.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00232-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00232-6).
- Sawada, H., E. Tanaka, S. Ban, C. Yamasaki, J. Fujino, K. Ooura, Y. Abe, K. Matsumoto and H. Yokosawa (2004). "Self/nonself recognition in ascidian fertilization: vitelline coat protein HrVC70 is a candidate allorecognition molecule." Proceedings of the National Academy of Sciences **101**(44): 15615-15620.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0401928101>.
- Schmidt, C. E., A. F. Horwitz, D. A. Lauffenburger and M. P. Sheetz (1993). "Integrin-cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic, asymmetric, and regulated." The Journal of Cell Biology **123**(4): 977-991.  
url: <http://jcb.rupress.org/content/123/4/977.long>.
- Schneeweiss, H. and L. Renwanz (1993). "Analysis of the attraction of haemocytes from *Mytilus edulis* by molecules of bacterial origin." Developmental & Comparative Immunology **17**(5): 377-387.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0145-305X\(93\)90029-P](http://dx.doi.org/10.1016/0145-305X(93)90029-P).
- Scotto, K. and D. Egan (1998). Transcriptional regulation of MDR genes. Multiple Drug Resistance in Cancer 2. M. Clynes, Springer Netherlands: 257-269.
- Scotto, K. W. (2003). "Transcriptional regulation of ABC drug transporters." Oncogene **22**(47): 7496-7511.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1206950>.
- Serpentini, A., C. Ghayor, J. M. Poncet, V. Hebert, P. Galéra, J. P. Pujol, E. Boucaud-Camou and J. M. Lebel (2000). "Collagen study and regulation of the de novo synthesis by IGF-I in hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*." Journal of Experimental Zoology **287**(4): 275-284.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1002/1097-010x\(20000901\)287:4<275::aid-jez2>3.0.co;2-8](http://dx.doi.org/10.1002/1097-010x(20000901)287:4<275::aid-jez2>3.0.co;2-8).
- Sharon, N. and H. Lis (1989). "Lectins as cell recognition molecules." Science **246**(4927): 227-234.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.2552581>.
- Sharon, N. and H. Lis (2004). "History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules." Glycobiology **14**(11): 53R-62R.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwh122>.
- Sheehan, D. and A. Power (1999). "Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology **123**(3): 193-199.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0742-8413\(99\)00033-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0742-8413(99)00033-X).
- Shemesh, T., A. B. Verkhovskiy, T. M. Svitkina, A. D. Bershadsky and M. M. Kozlov (2009). "Role of focal adhesions and mechanical stresses in the formation and progression of the lamellum interface." Biophysical Journal **97**(5): 1254-1264.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2009.05.065>.
- Shigei, T., H. Tsuru, N. Ishikawa and K. Yoshioka (2001). "Absence of endothelium in invertebrate blood vessels: significance of endothelium and sympathetic nerve/medial smooth muscle in the vertebrate vascular system." The Japanese Journal of Pharmacology **87**(4): 253-260.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1254/jjp.87.253>.
- Shipp, L. E. and A. Hamdoun (2012). "ATP-binding cassette (ABC) transporter expression and localization in sea urchin development." Developmental Dynamics **241**(6): 1111-1124.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.23786>.
- Sinha, R. P. and D.-P. Häder (2002). "UV-induced DNA damage and repair: a review." Photochemical & Photobiological Sciences **1**(4): 225-236.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/B201230H>.
- Small, J. V., K. Anderson and K. Rottner (1996). "Actin and the coordination of protrusion, attachment and retraction in cell crawling." Bioess Rep **16**(5): 351-368.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01207261>.
- Smital, T. and B. Kurelec (1998). "The activity of Multixenobiotic Resistance Mechanism determined by rhodamine B-efflux method as a biomarker of exposure." Marine Environmental Research **46**(1-5): 443-447.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(97\)00087-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(97)00087-1).

- Smital, T., R. Sauerborn, B. Pivcevic, S. Krca and B. Kurelec (2000). "Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology **126**(2): 175-186.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0742-8413\(00\)00110-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0742-8413(00)00110-9).
- Smith, L., J. Rast, V. Brockton, D. Terwilliger, S. Nair, K. Buckley and A. Majeske (2006). "The sea urchin immune system." Invertebrate Survival Journal **3**: 25-39.  
url: [www.isj.unimo.it/articoli/ISJ114.pdf](http://www.isj.unimo.it/articoli/ISJ114.pdf).
- Smith, P., J. Mwangi, Y. Afrane, G. Yan, D. Obbard, L. Ranford-Cartwright and T. Little (2011). "Alternative splicing of the *Anopheles gambiae* Dscam gene in diverse *Plasmodium falciparum* infections." Malaria Journal **10**(1): 156.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-10-156>.
- Smith, V. J. (2001). *Immunology of Invertebrates: Cellular*. eLS, John Wiley & Sons, Ltd.
- Smolarz, K., M. Wołowicz and M. Stachnik (2006). "First record of the occurrence of "gill disease" in *Mytilus edulis trossulus* from the Gulf of Gdańsk (Baltic Sea, Poland)." Journal of Invertebrate Pathology **93**(3): 207-209.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2006.07.005>.
- Smyth, M. J. and J. A. Trapani (1995). "Granzymes: exogenous proteases that induce target cell apoptosis." Immunology Today **16**(4): 202-206.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80122-7](http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699(95)80122-7).
- Söderhäll, I., E. Bangyeekhun, S. Mayo and K. Söderhäll (2003). "Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*." Developmental & Comparative Immunology **27**(8): 661-672.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X\(03\)00039-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X(03)00039-9).
- Söderhäll, K. and L. Cerenius (1998). "Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity." Current Opinion in Immunology **10**(1): 23-28.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80026-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80026-5).
- Söderhäll, K., V. Smith and M. Johansson (1986). "Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular co-operation in the defence reactions of arthropods." Cell and Tissue Research **245**(1): 43-49.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00218085>.
- Sonthei, M., M. Toubiana, A. Pallavicini, P. Venier and P. Roch (2011). "Diversity of coding sequences and gene structures of the antifungal peptide Mytimycin (MytM) from the Mediterranean Mussel, *Mytilus galloprovincialis*." Marine Biotechnology **13**(5): 857-867.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10126-010-9345-4>.
- Sottrup-Jensen, L. (1989). "Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation." The Journal of Biological Chemistry **264**(20): 11539-11542.  
url: <http://www.jbc.org/content/264/20/11539.long>.
- Sparreboom, A., R. Danesi, Y. Ando, J. Chan and W. D. Figg (2003). "Pharmacogenomics of ABC transporters and its role in cancer chemotherapy." Drug Resistance Updates **6**(2): 71-84.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1368-7646\(03\)00005-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1368-7646(03)00005-0).
- Stefano, G. B., P. Cadet and B. Scharrer (1989). "Stimulatory effects of opioid neuropeptides on locomotory activity and conformational changes in invertebrate and human immunocytes: evidence for a subtype of delta receptor." Proceedings of the National Academy of Sciences **86**(16): 6307-6311.  
url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC297827/>.
- Stefano, G. B., M. K. Leung, X. H. Zhao and B. Scharrer (1989). "Evidence for the involvement of opioid neuropeptides in the adherence and migration of immunocompetent invertebrate hemocytes." Proceedings of the National Academy of Sciences **86**(2): 626-630.  
url: <http://www.pnas.org/content/86/2/626.full.pdf>.
- Stein, U., W. Walther and V. Wunderlich (1994). "Point mutations in the *mdr1* promoter of human osteosarcomas are associated with in vitro responsiveness to multidrug resistance relevant drugs." European journal of cancer **30A**(10): 1541-1545.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0959-8049\(94\)00287-F](http://dx.doi.org/10.1016/0959-8049(94)00287-F).

- Stolarczyk, E. I., C. J. Reiling and C. M. Paumi (2011). "Regulation of ABC transporter function via phosphorylation by protein kinases." Curr Pharm Biotechnol **12**(4): 621-635.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/138920111795164075>.
- Stone, E. F., B. O. Fulton, J. S. Ayres, L. N. Pham, J. Ziauddin and M. M. Shirasu-Hiza (2012). "The circadian clock protein timeless regulates phagocytosis of bacteria in *Drosophila*." PLoS Pathogens **8**(1): e1002445.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002445>.
- Stuart, L. M. and R. A. B. Ezekowitz (2005). "Phagocytosis: Elegant Complexity." Immunity **22**(5): 539-550.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2005.05.002>.
- Sullivan, S. J., G. Daukas and S. H. Zigmond (1984). "Asymmetric distribution of the chemotactic peptide receptor on polymorphonuclear leukocytes." The Journal of Cell Biology **99**(4 Pt 1): 1461-1467.  
url: <http://jcb.rupress.org/content/99/4/1461.full.pdf>.
- Suzuki, T. and K. Mori (1990). "Hemolymph lectin of the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*: a possible non-self recognition system." Dev Comp Immunol **14**(2): 161-173.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0145-305X\(90\)90088-V](http://dx.doi.org/10.1016/0145-305X(90)90088-V).
- Suzuki, T., R. Yoshinaka, S. Mizuta, S. Funakoshi and K. Wada (1991). "Extracellular matrix formation by amoebocytes during epithelial regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata*." Cell and Tissue Research **266**(1): 75-82.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00678713>.
- Svensson, S., A. Särngren and L. Förlin (2003). "Mussel blood cells, resistant to the cytotoxic effects of okadaic acid, do not express cell membrane p-glycoprotein activity (multixenobiotic resistance)." Aquatic Toxicology **65**(1): 27-37.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00097-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00097-3).
- Svitkina, T. M., E. A. Bulanova, O. Y. Chaga, D. M. Vignjevic, S.-i. Kojima, J. M. Vasiliev and G. G. Borisy (2003). "Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network." The Journal of Cell Biology **160**(3): 409-421.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200210174>.
- Svobodova, A., D. Walterova and J. Vostalova (2006). "Ultraviolet light induced alteration to the skin." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **150**(1): 25-38.  
url: <http://mefanet.upol.cz/BP/2006/1/25.pdf>.
- Synold, T. W., I. Dussault and B. M. Forman (2001). "The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux." Nature Medicine **7**(5): 584-590.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/87912>.
- Tafalla, C., J. Gomez-Leon, B. Novoa and A. Figueras (2003). "Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes." Developmental & Comparative Immunology **27**(3): 197-205.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X\(02\)00098-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00098-8).
- Tafalla, C., B. Novoa and A. Figueras (2002). "Production of nitric oxide by mussel (*Mytilus galloprovincialis*) hemocytes and effect of exogenous nitric oxide on phagocytic functions." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **132**(2): 423-431.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00050-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00050-7).
- Tanguy, A., N. Bierne, C. Saavedra, B. Pina, E. Bachère, M. Kube, E. Bazin, F. Bonhomme, P. Boudry, V. Boulo, I. Boutet, L. Cancela, C. Dossat, P. Favrel, A. Huvet, S. Jarque, D. Jollivet, S. Klages, S. Lapègue, R. Leite, J. Moal, D. Moraga, R. Reinhardt, J.-F. Samain, E. Zouros and A. Canario (2008). "Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: Development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution." Gene **408**(1-2): 27-36.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2007.10.021>.
- Tanguy, M. (2013). **Thèse:** Réponses physiologiques et variations du transcriptome hémocyttaire de *Mytilus edulis* lors d'une infection par *Vibrio splendidus*. PhD, Université du Havre.
- Tanguy, M., P. McKenna, S. Gauthier-Clerc, J. Pellerin, J.-M. Danger and A. Siah (2013). "Functional and molecular responses in *Mytilus edulis* hemocytes exposed to bacteria, *Vibrio splendidus*." Developmental & Comparative Immunology **39**(4): 419-429.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2012.10.015>.

- Tasumi, S. and G. R. Vasta (2007). "A galectin of unique domain organization from hemocytes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*." The Journal of Immunology **179**(5): 3086-3098.  
url: [www.jimmunol.org/content/179/5/3086.long](http://www.jimmunol.org/content/179/5/3086.long).
- Thannickal, V. J. and B. L. Fanburg (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology **279**(6): L1005-L1028.  
url: <http://ajplung.physiology.org/content/279/6/L1005.long>.
- Theodoulou, F. L. (2000). "Plant ABC transporters." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1465**(1-2): 79-103.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00132-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00132-2).
- Theopold, U., O. Schmidt, K. Soderhall and M. S. Dushay (2004). "Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing." Trends Immunology **25**(6): 289-294.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2004.03.004>.
- Thompson, F. L., B. Austin, J. G. Swings and A. S. f. Microbiology (2006). The Biology of Vibrios, ASM Press.
- Timpl, R. and M. Dziadek (1986). "Structure, development, and molecular pathology of basement membranes." Int Rev Exp Pathol **29**: 1-112.  
url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3536789>.
- Timsit, Y. E. and M. Negishi (2007). "CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors." Steroids **72**(3): 231-246.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.steroids.2006.12.006>.
- Tincu, J. A. and S. W. Taylor (2004). "Antimicrobial peptides from marine invertebrates." Antimicrob Agents Chemother **48**(10): 3645-3654.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128%2FAAC.48.10.3645-3654.2004>.
- Tomanek, L. and M. J. Zuzow (2010). "The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress: implications for thermal tolerance limits and metabolic costs of thermal stress." The Journal of Experimental Biology **213**(20): 3559-3574.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.041228>.
- Tonegawa, S. (1983). "Somatic generation of antibody diversity." Nature **302**(5909): 575-581.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/302575a0>.
- Torreilles, J. and M.-C. Guerin (1999). "Production of peroxynitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes in vitro." Fish & Shellfish Immunology **9**(7): 509-518.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/fsim.1998.0200>.
- Toubiana, M., M. Gerdol, U. Rosani, A. Pallavicini, P. Venier and P. Roch (2012). "Toll-like receptors and MyD88 adaptors in *Mytilus*: Complete cds and gene expression levels." Developmental & Comparative Immunology **40**(2): 158-166.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2013.02.006>.
- Townson, D. and A. Liptak (2003). "Chemokines in the corpus luteum: Implications of leukocyte chemotaxis." Reproductive Biology and Endocrinology **1**(1): 94.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186%2F1477-7827-1-94>.
- Tsakas, S. and V. J. Marmaras (2010). "Insect immunity and its signalling: an overview." Invertebrate Survival Journal **7**(2): 228-238.  
url: [www.isj.unimo.it/articoli/ISJ226.pdf](http://www.isj.unimo.it/articoli/ISJ226.pdf).
- Tsan, M.-F. and B. Gao (2009). "Heat shock proteins and immune system." Journal of Leukocyte Biology **85**(6): 905-910.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0109005>.
- Ueda, K., Y. Taguchi and M. Morishima (1997). "How does P-glycoprotein recognize its substrates?" Seminars in Cancer Biology **8**(3): 151-159.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/scbi.1997.0066>.
- Urbatsch, I. L. and A. E. Senior (1995). "Effects of lipids on ATPase activity of purified Chinese hamster P-Glycoprotein." Arch Biochem Biophys **316**(1): 135-140.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1995.1020>.
- Ursic-Bedoya, R. J., H. Nazzari, D. Cooper, O. Triana, M. Wolff and C. Lowenberger (2008). "Identification and characterization of two novel lysozymes from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease." Journal of Insect Physiology **54**(3): 593-603.

- DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.12.009>.
- van de Ven, R., G. L. Scheffer, A. W. Reurs, J. J. Lindenberg, R. Oerlemans, G. Jansen, J.-P. Gillet, J. N. Glasgow, A. Pereboev, D. T. Curiel, R. J. Scheper and T. D. de Gruijl (2008). "A role for multidrug resistance protein 4 (MRP4; ABCC4) in human dendritic cell migration." *Blood* **112**(6): 2353-2359. DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-03-147850>.
- Van Herreweghe, J. M. and C. W. Michiels (2012). "Invertebrate lysozymes: diversity and distribution, molecular mechanism and in vivo function." *J Biosci* **37**(2): 327-348. url: <http://www.ias.ac.in/jbiosci/jun2012/327.pdf>.
- Vasta, G. R., H. Ahmed, N. E. Fink, M. T. Elola, A. G. Marsh, A. Snowden and E. W. Odom (1994). "Animal Lectins as Self/Non-Self Recognition Molecules." *Ann N Y Acad Sci* **712**(1): 55-73. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb33562.x>.
- Vellenga, E., L. Tuyt, B.-J. Wierenga, M. Müller and W. Dokter (1999). "Interleukin-6 production by activated human monocytic cells is enhanced by MK-571, a specific inhibitor of the multi-drug resistance protein-1." *British Journal of Pharmacology* **127**(2): 441-448. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0702577>.
- Venier, P., C. De Pitta, F. Bernante, L. Varotto, B. De Nardi, G. Bovo, P. Roch, B. Novoa, A. Figueras, A. Pallavicini and G. Lanfranchi (2009). "MytiBase: a knowledgebase of mussel (*M. galloprovincialis*) transcribed sequences." *BMC Genomics* **10**(1): 72. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-10-72>.
- Venier, P., A. Pallavicini, B. De Nardi and G. Lanfranchi (2003). "Towards a catalogue of genes transcribed in multiple tissues of *Mytilus galloprovincialis*." *Gene* **314**(0): 29-40. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1119\(03\)00708-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1119(03)00708-x).
- Venier, P., L. Varotto, U. Rosani, C. Millino, B. Celegato, F. Bernante, G. Lanfranchi, B. Novoa, P. Roch, A. Figueras and A. Pallavicini (2011). "Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*." *BMC Genomics* **12**(1): 69. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-12-69>.
- Versantvoort, C. H., T. Bagrij, K. A. Wright and P. R. Twentyman (1995). "On the relationship between the probenecid-sensitive transport of daunorubicin or calcein and the glutathione status of cells overexpressing the multidrug resistance-associated protein (MRP)." *International Journal of Cancer* **63**(6): 855-862. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.2910630617>.
- Vilaboa, N. E., A. Galán, A. Troyano, E. de Blas and P. Aller (2000). "Regulation of Multidrug Resistance 1 (MDR1)/P-glycoprotein gene expression and activity by Heat-Shock Transcription Factor 1 (HSF1)." *Journal of Biological Chemistry* **275**(32): 24970-24976. DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M909136199>.
- Villalba, A., S. G. Mourelle, M. J. Carballal and C. López (1997). "Symbionts and diseases of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture process in the Rías of Galicia (NW Spain)." *Dis Aquat Organ* **31**(2): 127-139. DOI: <http://dx.doi.org/10.3354/dao031127>.
- Villamil, L., J. Gomez-Leon and M. Gomez-Chiarri (2007). "Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*." *Developmental and comparative immunology* **31**(10): 968-977. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2007.01.006>.
- Vorotnikov, A. (2011). "Chemotaxis: Movement, direction, control." *Biochemistry (00062979)* **76**(13): 1528-1555. DOI: <http://dx.doi.org/10.1134/s0006297911130104>.
- Vuitton, D. (2009). *Immunologie*. Rueil-Malmaison, Editions Pradel.
- Wallin, R. P., A. Lundqvist, S. H. More, A. von Bonin, R. Kiessling and H. G. Ljunggren (2002). "Heat-shock proteins as activators of the innate immune system." *Trends in Immunology* **23**(3): 130-135. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02168-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02168-8).
- Wang, L., L. Song, J. Zhao, L. Qiu, H. Zhang, W. Xu, H. Li, C. Li, L. Wu and X. Guo (2009). "Expressed sequence tags from the zhikong scallop (*Chlamys farreri*): Discovery and annotation of host-defense genes." *Fish & Shellfish Immunology* **26**(5): 744-750. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.03.002>.

- Watermann, B. T., M. Herlyn, B. Daehne, S. Bergmann, M. Meemken and H. Kolodzey (2008). "Pathology and mass mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in 2005 at the East Frisian coast, Germany." J Fish Dis **31**(8): 621-630.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.00953.x>.
- Watson, F. L., R. Puttmann-Holgado, F. Thomas, D. L. Lamar, M. Hughes, M. Kondo, V. I. Rebel and D. Schmucker (2005). "Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects." Science **309**(5742): 1874-1878.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1116887>.
- Weisburg, J. H., M. Curcio, P. C. Caron, G. Raghu, E. B. Mechetner, P. D. Roepe and D. A. Scheinberg (1996). "The multidrug resistance phenotype confers immunological resistance." The Journal of experimental medicine **183**(6): 2699-2704.  
url: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2192622/>.
- Weisburg, J. H., P. D. Roepe, S. Dzekunov and D. A. Scheinberg (1999). "Intracellular pH and multidrug resistance regulate complement-mediated cytotoxicity of nucleated human cells." The Journal of Biological Chemistry **274**(16): 10877-10888.  
url: <http://www.jbc.org/content/274/16/10877.long>.
- Weiss, J., D. Theile, N. Ketabi-Kiyanvash, H. Lindenmaier and W. E. Haefeli (2007). "Inhibition of MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, and MRP3/ABCC3 by nucleoside, nucleotide, and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors." Drug Metabolism and Disposition **35**(3): 340-344.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.106.012765>.
- Wherlock, M. and H. Mellor (2002). "The Rho GTPase family: a Racs to Wrchs story." Journal of Cell Science **115**(2): 239-240.  
url: <http://jcs.biologists.org/content/115/2/239.full>.
- Wood, W., C. Faria and A. Jacinto (2006). "Distinct mechanisms regulate hemocyte chemotaxis during development and wound healing in *Drosophila melanogaster*." The Journal of Cell Biology **173**(3): 405-416.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200508161>.
- Wootton, E. C., E. A. Dyrinda, R. K. Pipe and N. A. Ratcliffe (2003a). "Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs." Aquatic Toxicology **65**(1): 13-25.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00098-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00098-5).
- Wootton, E. C., E. A. Dyrinda and N. A. Ratcliffe (2003b). "Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*)." Fish & Shellfish Immunology **15**(3): 195-210.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1050-4648\(02\)00161-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1050-4648(02)00161-4).
- Wu, C. T., M. Budding, M. S. Griffin and J. M. Croop (1991). "Isolation and characterization of *Drosophila* multidrug resistance gene homologs." Molecular and cellular biology **11**(8): 3940-3948.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.11.8.3940>.
- Xu, C., C. Y. Li and A. N. Kong (2005). "Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics." Arch Pharm Res **28**(3): 249-268.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02977789>.
- Xue, Q.-G., G. L. Waldrop, K. L. Schey, N. Itoh, M. Ogawa, R. K. Cooper, J. N. Losso and J. F. La Peyre (2006). "A novel slow-tight binding serine protease inhibitor from eastern oyster (*Crassostrea virginica*) plasma inhibits perkinsin, the major extracellular protease of the oyster protozoan parasite *Perkinsus marinus*." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **145**(1): 16-26.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.05.010>.
- Xue, Q., M. E. Hellberg, K. L. Schey, N. Itoh, R. I. Eytan, R. K. Cooper and J. F. La Peyre (2010). "A new lysozyme from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a possible evolutionary pathway for i-type lysozymes in bivalves from host defense to digestion." BMC Evol Biol **10**: 213.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-10-213>.
- Xue, Q., N. Itoh, K. L. Schey, R. K. Cooper and J. F. La Peyre (2009). "Evidence indicating the existence of a novel family of serine protease inhibitors that may be involved in marine invertebrate immunity." Fish & Shellfish Immunology **27**(2): 250-259.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.05.006>.

- Xue, Q. G., N. Itoh, K. L. Schey, Y. L. Li, R. K. Cooper and J. F. La Peyre (2007). "A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of i-type lysozymes." Cellular and Molecular Life Sciences **64**(1): 82-95.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-006-6386-y>.
- Xue, Q. G., K. L. Schey, A. K. Volety, F. L. Chu and J. F. La Peyre (2004). "Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*)." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **139**(1): 11-25.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.05.011>.
- Yip, E. C., Y. H. Wong and J. T. Wong (2001). "Bacterial formyl peptide mediated chemotaxis and extracellular acidification in shrimp haemocytes." Developmental & Comparative Immunology **25**(4): 269-277.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X\(00\)00060-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X(00)00060-4).
- Yutin, N., M. Wolf, Y. Wolf and E. Koonin (2009). "The origins of phagocytosis and eukaryogenesis." Biology Direct **4**(1): 9.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1745-6150-4-9>.
- Zaja, R., G. I. Klobucar, R. Sauerborn Klobucar, B. K. Hackenberger and T. Smital (2006). "Haemolymph as compartment for efficient and non-destructive determination of P-glycoprotein (Pgp) mediated MXR activity in bivalves." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **143**(1): 103-112.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.12.009>.
- Zasloff, M. (2002). "Antimicrobial peptides of multicellular organisms." Nature **415**(6870): 389-395.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/415389a>.
- Zhang, G., X. Fang, X. Guo, L. Li, R. Luo, F. Xu, P. Yang, L. Zhang, X. Wang, H. Qi, Z. Xiong, H. Que, Y. Xie, P. W. Holland, J. Paps, Y. Zhu, F. Wu, Y. Chen, J. Wang, C. Peng, J. Meng, L. Yang, J. Liu, B. Wen, N. Zhang, Z. Huang, Q. Zhu, Y. Feng, A. Mount, D. Hedgecock, Z. Xu, Y. Liu, T. Domazet-Loso, Y. Du, X. Sun, S. Zhang, B. Liu, P. Cheng, X. Jiang, J. Li, D. Fan, W. Wang, W. Fu, T. Wang, B. Wang, J. Zhang, Z. Peng, Y. Li, N. Li, M. Chen, Y. He, F. Tan, X. Song, Q. Zheng, R. Huang, H. Yang, X. Du, L. Chen, M. Yang, P. M. Gaffney, S. Wang, L. Luo, Z. She, Y. Ming, W. Huang, B. Huang, Y. Zhang, T. Qu, P. Ni, G. Miao, Q. Wang, C. E. Steinberg, H. Wang, L. Qian, X. Liu and Y. Yin (2012). "The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation." Nature **490**(7418): 49-54.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11413>.
- Zhang, H., H. Wang, L. Wang, X. Song, J. Zhao, L. Qiu, L. Li, M. Cong and L. Song (2009). "A novel C-type lectin (Cflec-3) from *Chlamys farreri* with three carbohydrate-recognition domains." Fish & Shellfish Immunology **26**(5): 707-715.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.02.017>.
- Zhang, S.-M., C. M. Adema, T. B. Kepler and E. S. Loker (2004). "Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate." Science Signalling **305**(5681): 251.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1088069>.
- Zhang, S. M. and E. S. Loker (2003). "The FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*: additional members, and evidence consistent with alternative splicing and FREP retrosequences. Fibrinogen-related proteins." Developmental and comparative immunology **27**(3): 175-187.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X\(02\)00091-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00091-5).
- Zhang, S. M., Y. Zeng and E. S. Loker (2008). "Expression profiling and binding properties of fibrinogen-related proteins (FREPs), plasma proteins from the schistosome snail host *Biomphalaria glabrata*." Innate Immun **14**(3): 175-189.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/1753425908093800>.
- Zhao, J., L. Qiu, X. Ning, A. Chen, H. Wu and C. Li (2010). "Cloning and characterization of an invertebrate type lysozyme from *Venerupis philippinarum*." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **156**(1): 56-60.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.02.001>.
- Zhou, G. and M. T. Kuo (1997). "NF- $\kappa$ B-mediated induction of *mdr1b* expression by insulin in rat hepatoma cells." Journal of Biological Chemistry **272**(24): 15174-15183.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.24.15174>.

- Zhou, Y., M. M. Gottesman and I. Pastan (1999). "The extracellular loop between TM5 and TM6 of P-Glycoprotein is required for reactivity with monoclonal antibody UIC2." Arch Biochem Biophys **367**(1): 74-80.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1999.1221>.
- Zimmerman, B., T. Volberg and B. Geiger (2004). "Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading." Cell Motil Cytoskeleton **58**(3): 143-159.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cm.20005>.
- Zinkernagel, R. M. and P. C. Doherty (1974). "Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis." Nature **251**(5475): 547-548.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/251547a0>.
- Zobell, C. E. F., C.B. (1938). "Bacteria as food for certain marine invertebrates." Journal of Marine Research **1** 312-327.  
url.
- Zwaal, R. F. A., P. Comfurius and E. M. Bevers (2004). "Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids **1636**(2-3): 119-128.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2003.07.003>.



# *ANNEXES*

---



## ARTICLE 5

# Different modalities of intercellular membrane exchanges mediate cell-to-cell p-glycoprotein transfers in mcf-7 breast cancer cells.

Pasquier, J., Galas, L., Boulange-Lecomte, C., Rioult, D., Bultelle, F., Magal, P., Webb G. & Le Foll, F.

(2012)

La résistance multiple aux médicaments (MDR) est un phénomène par lequel les cellules tumorales présentent une résistance à une variété de médicaments de chimiothérapie sans parenté chimique. La forme classique de multirésistance aux médicaments est liée à la surexpression, à la membrane, de la glycoprotéine P (P-gp), qui agit comme une pompe d'efflux énergie dépendante des drogues. L'expression de la P-glycoprotéine est connue pour être contrôlée par des mécanismes génétiques et épi-génétiques. Jusqu'à présent, les processus de régulation du gène P-gp et la sélection des cellules résistantes ont été jugées suffisantes pour expliquer l'émergence de phénotype MDR au sein d'une population de cellules. Cependant, récemment, des acquisitions «non génétiques» de MDR par transferts de P-gp de cellule à cellule ont été signalées. Dans la présente étude, nous montrons que les transferts intercellulaires de P-gp fonctionnels surviennent par deux modalités différentes mais complémentaires à travers des interactions de cellule donneuse-receveuse en l'absence de pression de sélection par les drogues. Le transfert de la P-glycoprotéine et de l'activité d'efflux ont été suivies pendant 7 jours par microscopie confocale et la cytométrie de flux dans des co-cultures de cellules parentales de MCF-7 du cancer du sein sensibles aux médicaments avec des variants résistants surexprimant la P-gp. Un processus rapide de transfert à distance a été établi sur la base de la sécrétion et l'attachement de microparticules contenant de la P-gp. Le transfert médié par les microparticules a été détecté après seulement 4 heures d'incubation. Nous identifions également un autre mode de transfert par contact, constitué d'un trafic de P-gp de cellule à cellule par des tunnels de nanotubes formant des ponts entre cellules voisines. Nos résultats fournissent de nouvelles preuves mécanistiques de l'émergence extra-génétique du phénotype MDR dans les cellules cancéreuses et indiquent que de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à surmonter le phénotype MDR peuvent inclure l'inhibition des microparticules et de tunnels de nanotubes permettant le transfert intercellulaire de P-gp.

*J Biol Chem*, 287(10), 7374-7387

doi: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.312157>



# Different Modalities of Intercellular Membrane Exchanges Mediate Cell-to-cell P-glycoprotein Transfers in MCF-7 Breast Cancer Cells<sup>\*S</sup>

Received for publication, October 12, 2011, and in revised form, December 13, 2011. Published, JBC Papers in Press, January 6, 2012, DOI 10.1074/jbc.M111.312157.

Jennifer Pasquier<sup>†S1</sup>, Ludovic Galas<sup>5</sup>, Céline Boulangé-Lecomte<sup>†</sup>, Damien Rioult<sup>†</sup>, Florence Bultelle<sup>†</sup>, Pierre Magal<sup>¶</sup>, Glenn Webb<sup>||</sup>, and Frank Le Foll<sup>†2</sup>

From the <sup>†</sup>Laboratory of Ecotoxicology, University of Le Havre, 76058 Le Havre, France, <sup>5</sup>PRIMACEN, Cell Imaging Platform of Normandy, Inserm, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France, <sup>¶</sup>UMR CNRS 5251 IMB and INRIA sud-ouest Anubis, University of Bordeaux, 33076 Bordeaux, France, and the <sup>||</sup>Department of Mathematics, Vanderbilt University, Stevenson Center, Nashville, Tennessee 37240

**Background:** The P-glycoprotein is expressed in many human cancers, where it contributes to multi-drug resistance phenomenon.

**Results:** Both TnTs and microparticles contribute to the transfer of P-gp in MCF-7.

**Conclusion:** Our findings supply new mechanistic evidences for the extragenetic emergence of MDR in cancer cells.

**Significance:** Inhibition of both MPs and TnTs could be included in treatment strategies designed to overcome MDR.

Multi-drug resistance (MDR) is a phenomenon by which tumor cells exhibit resistance to a variety of chemically unrelated chemotherapeutic drugs. The classical form of multidrug resistance is connected to overexpression of membrane P-glycoprotein (P-gp), which acts as an energy dependent drug efflux pump. P-glycoprotein expression is known to be controlled by genetic and epigenetic mechanisms. Until now processes of P-gp gene up-regulation and resistant cell selection were considered sufficient to explain the emergence of MDR phenotype within a cell population. Recently, however, “non-genetic” acquisitions of MDR by cell-to-cell P-gp transfers have been pointed out. In the present study we show that intercellular transfers of functional P-gp occur by two different but complementary modalities through donor-recipient cells interactions in the absence of drug selection pressure. P-glycoprotein and drug efflux activity transfers were followed over 7 days by confocal microscopy and flow cytometry in drug-sensitive parental MCF-7 breast cancer cells co-cultured with P-gp overexpressing resistant variants. An early process of remote transfer was established based on the release and binding of P-gp-containing microparticles. Microparticle-mediated transfers were detected after only 4 h of incubation. We also identify an alternative mode of transfer by contact, consisting of cell-to-cell P-gp trafficking by tunneling nanotubes bridging neighboring cells. Our findings supply new mechanistic evidences for the extragenetic emergence of MDR in cancer cells and indicate that new treatment strategies designed to overcome MDR may include inhibition of both microparticles and Tunneling nanotube-mediated intercellular P-gp transfers.

P-glycoprotein (P-gp)<sup>3</sup> is a 170-kDa plasma membrane ATP binding cassette transporter encoded by the human *MDR1/ABC1* gene that uses energy from ATP hydrolysis to actively efflux compounds from the cell (1–3). Physiological functions of P-gp rely on two remarkable molecular and cellular features. First, the substrate binding pocket of P-gp fits to a variety of chemically unrelated molecules, giving the protein the ability to transport a broad spectrum of substances encompassing lipids, peptides, and xenobiotics (4–6). Second, native expression of the *MDR1/ABC1* gene is essentially restricted to tissue-blood epithelia in the brain, placenta, liver, testis, colon, and kidney in addition to isolated hematopoietic stem and immune cells (7–9). As a consequence, P-gp drains a variety of compounds across physiologic permeation barriers and lowers their concentrations in cell compartment.

In cancers developing from tissues possessing a natively high *MDR1/ABC1* expression, the P-gp-mediated efflux of anti-cancer agents severely limits the efficacy of chemotherapy (10). In these tumors P-gp is, therefore, one of the major contributors to intrinsic multidrug resistance (MDR) (11). For other cancers, exposure to cytotoxics causes up-regulation of P-gp in neoplastic cells with a low basal level of the transporter and also induces a *de novo* expression of *MDR1/ABC1* in non-expressing cells (12–14). Such cancers become secondarily multidrug resistant after a drug-induced switch-on of *MDR1/ABC1* overexpression. Diverse mechanisms have been reported for contributing to *MDR1/ABC1* up-regulation, including genomic instability, genetic induction of upstream or downstream *MDR1/ABC1* promoters, in particular via the nuclear steroid and xenobiotic receptor, and epigenetic changes based on DNA methylation, histone acetylation, and microRNAome modifications (15–20). In all these pathways the pressure

\* This work was supported by European Regional Development Fund as part of the Interreg IVA project Admin (Trans-Channel Advanced Microscopy network).

<sup>S</sup> This article contains supplemental Fig. 1 and supplemental videos 1 and 2.

<sup>1</sup> Recipient of a fellowship from the Conseil Régional de Haute-Normandie.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: frank.lefoll@univ-lehavre.fr.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: P-gp, P-glycoprotein; MDR, multidrug resistance; MP, microparticle; WGA, agglutinin; TRITC, tetramethylrhodamine isothiocyanate; PE, phycoerythrin; FL, fluorescent light; HBSS, Hanks' balanced salt solution.

exerted by cytotoxics converges to a positive *MDR1/ABCB1* regulation followed by a selection and expansion of MDR cells in tumors (21, 22).

In 2005 Levchenko *et al.* (23) reported an additional mode of MDR acquisition in which intercellular transfers of P-gp arise between resistant P-gp overexpressing cells as donors and drug-sensitive cells as recipients. They showed that extragenetic acquisition of P-gp occurs both *in vitro* and *in vivo* and confers a MDR phenotype without *MDR1/ABCB1* expression in the recipient cells. From observations using co-cultures of adherent BE (2)-C cells with MDR sublines, the authors suggested that cell-to-cell P-gp transfers were contact-dependent. Similar transfers of P-gp through heterocellular contacts have been described between resistant mesothelial and sensitive epithelial ovarian cancer cells (24). Conversely, in a model of liquid tumor, an alternative mechanism of intercellular P-gp trafficking has been identified. In that case, MDR variants of the CCRF-CEM lymphoblastic leukemia cell line release P-gp-containing microparticles (MPs) that bind to drug-sensitive cells and transfer the protein and the efflux activity (25). As a whole, these studies indicate that a certain spreading of the MDR phenotype within cell populations originates in extragenetic transfers of P-gp. The phenomenon takes place in the absence of cytotoxic pressure, between different cell types, in various environments and, obviously, through distinct mechanisms. Nevertheless, the end effects of P-gp spreading may strongly depend on the mode of transfer. In a recent work we quantified some features of P-gp transfers in co-cultures of human breast cancer MCF-7 cells and used the data to feed a mathematical model, based on local P-gp exchanges, to estimate the rate and the consequences of P-gp exchanges in cell populations (26). However, the role of MPs as potential long distance P-gp vectors has not been considered. In the same way the preceding studies have been focused on MPs-mediated (25) or on contact-mediated P-gp transfers (23, 24) without considering a possible role of both pathways in the acquisition of MDR.

Herein, we identify intercellular membrane nanotubes, also termed cytonemes or tunneling nanotubes (TnTs), as short distance P-gp carriers between MCF-7 cells *in vitro*. Our results indicate that local P-gp transfers mediated by TnTs co-exist with remote P-gp transfers via MPs and are together responsible for the extragenetic emergence of MDR in a sensitive subpopulation co-cultured with resistant cells.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cell Lines**—The cell lines used in the present study were wild-type drug-sensitive human breast adenocarcinoma MCF-7, purchased at the American Type Culture Collection, and a multidrug resistant MCF-7/DOXO variant, kindly provided by Pr. J.-P. Marie (Hôtel Dieu, Paris, France). The cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, and 1% antibiotic/antimycotic solution. Doxorubicin (1  $\mu$ M) was added to the culture medium for the maintenance of the multidrug-resistant phenotype of MCF-7/doxo cells. Cultured cells were incubated at 37 °C under a water-saturated 95% air, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Exposure of MCF-7/DOXO to the P-gp inhibitors verapamil or

cyclosporine A dose-dependently abolished both resistance to doxorubicin and P-gp activity in MCF-7/doxo (27).

**Confocal Microscopy**—Live cell microscopy was used to image TnTs. Cells were labeled with 1 mg/ml Alexa Fluor<sup>®</sup> 594-conjugated wheat germ agglutinin (WGA, Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) at 5  $\mu$ g/ml for 10 min at 37 °C in the dark. WGA is a probe for detecting glycoconjugates that selectively binds to *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylneuraminic acid residues of cell membranes.

Fixed cell confocal microscopy was performed by fixing cells in 3.7% formaldehyde in PBS for 5 min. Cells were then extensively washed in PBS, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS, and washed again in PBS. Cells were stained with a 50  $\mu$ g/ml TRITC-conjugated phalloidin (Sigma) to label actin filaments.

For immunolocalization of P-gp, direct staining was performed with a phycoerythrin (PE)-conjugated UIC2 monoclonal antibody (mAb) solution (Beckman Coulter, Villepinte, France). Alternatively, an indirect immunodetection was carried out by using a non-conjugated UIC2 mAb solution (Beckman Coulter) revealed with a goat anti-mouse IgG2a  $\gamma_{2a}$  chain specific as secondary antibody (Beckman Coulter) at 1  $\mu$ g/ml for 90 min. The UIC2 mAb reacts with an external epitope of P-gp.

For co-culture assays, 75% confluent-sensitive MCF-7 cells were loaded with 25  $\mu$ M concentrations of the cell-permeant reactive fluorescent dye CellTracker Green (5-chloromethyl-fluorescein diacetate, Invitrogen) or CellTracker Violet (2,3,6,7-tetrahydro-9-bromomethyl-1H,5H-quinolizino-(9,1-*gh*)-coumarin, Invitrogen) for 1 h at 37 °C in 25-cm<sup>2</sup> culture dishes. Cells were then washed twice with HBSS and covered with complete fresh culture medium. CellTracker is retained in living cells, inherited by daughter cells through several generations and not transferred to adjacent cells in a population. To prepare inserts for confocal microscopy, either CellTracker-loaded sensitive MCF-7 or MCF-7/DOXO or a carefully homogenized 50:50 mixture of ctgMCF-7:MCF-7/DOXO were plated at the desired density on glass coverslips placed in 35-mm culture dishes. Cells were allowed to adhere for 4 h. The culture medium was then completed, and cells were cultured for several hours or days according to assay. For P-gp immunodetection in mechanically dispersed co-cultures, mixtures of 50:50 ctgMCF-7:MCF-7/DOXO were directly grown in 35-mm dishes and mechanically dispersed just before plating on glass coverslips and staining with UIC2 mAb.

Slides were mounted in Mowiol (Calbiochem VWR International, Strasbourg, France). Imaging was performed using a Leica TCS SP2 upright confocal microscope (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France). Post-acquisition image analysis was performed with LAS AF 1.8.2. and Imaris (Bitplane AG, Zurich Switzerland).

**Extraction and Purification of Microparticles from Cell Cultures**—Microparticles purification was conducted by using a two-step protocol modified from previously published methods (28, 29). Briefly, cells were grown to 75% confluency, and the medium was collected. Cells were then submitted to a mild trypsin digestion in calcium-free-medium to release microparticles loosely bound to their surface. This second incubation

## Membrane Nanotubes and Microparticles Transfer P-gp in MCF-7

medium was also collected. Pooled media were centrifuged at  $2000 \times g$  for 10 min to remove floating cells and debris. Cell-free supernatant was then transferred in 8 ultracentrifuge tubes and spun down at  $100,000 \times g$  for 1 h. The supernatant was removed, and the pellet was resuspended in HBSS. All pellets were pooled in one single ultracentrifuge tube and centrifuged at  $100,000 \times g$  for 1 h. The final pellet containing purified microparticles was either resuspended in RPMI for treatment of cell cultures or lysed for protein extraction or labeled for cytometry analysis or microscopy imaging.

**Protein Extraction and Western Blot Analysis**—Cells or microparticles were lysed in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 0.1% Triton X-100, 0.15 mM KCl, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1.3 mM EDTA, and 2  $\mu$ M aprotinin. Protein lysates were placed on ice for 30 min, vortexed every 5 min, and cleared by centrifugation at  $3500 \times g$  for 15 min at 4 °C. The supernatants were collected and frozen at  $-80$  °C until analysis. Protein concentration in extracts was determined using the Bradford method. Aliquots (40  $\mu$ g) of total proteins extracted from cultured MCF-7 cells were subjected to electrophoresis through an 8% SDS-polyacrylamide gel at a constant voltage of 90 V in running buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM glycine, and 0.1% SDS). Proteins were then transferred to nitrocellulose membrane overnight at 120 mA in transfer buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 150 mM glycine, and 5% v/v methanol). The nitrocellulose membrane was blocked with 5% BSA in Tris-buffered saline (20 mM Tris, pH 7.6, 137 mM NaCl) for 2 h. Immunostaining was carried out using a mouse monoclonal P-gp C219 antibody (2  $\mu$ g/ml, Abcam, Cambridge, UK) and a secondary polyclonal rabbit anti-mouse IgG peroxidase-conjugated antibody (1/40,000, Sigma). The enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (GE Healthcare) was used for visualization of the secondary antibody as described in the manufacturer's manual. The signals from the blots were scanned using the ImageMaster TotalLab Version 1.11 software (GE Healthcare).

**Analysis of P-gp Expression and Activity by Flow Cytometry**—Cultured or co-cultured cells were trypsin-resuspended and washed with HBSS before analysis. The fluorescent light (FL) was quantified using a Cell Lab Quanta SC MPL flow cytometer (Beckman Coulter) equipped with a 22-milliwatt 488-nm excitation laser. Voltage settings of photomultipliers were not modified throughout the experiments. Each analysis consisted of a record of 10,000 events, triggered on electronic volume as primary parameter according to a particle diameter exceeding 8  $\mu$ m. For intercellular P-glycoprotein transfer studies, P-gp was labeled using the PE-conjugated UIC2 mAb, as for fluorescence microscopy. Red fluorescence was measured in FL2 channel (log scale) through a 575-nm band pass emission filter. More than  $93.1 \pm 0.4\%$  (mean  $\pm$  S.E.) of gated events exhibited a FL2  $>1$ . To study P-gp activity, resuspended cells were loaded with 0.25  $\mu$ M calcein acetoxymethyl ester (Invitrogen) in RPMI for 15 min at 37 °C in the dark. Green FL was quantified via the FL1 channel (log scale) through a 525-nm band pass filter. Controls of MCF-7, MCF-7/DOXO, and extemporaneous mixtures of 50:50 MCF-7: MCF-7/doxo were analyzed before co-cultures in all experiments.

**Co-incubation in Tissue Culture Inserts**—The parental drug-sensitive cell line MCF-7 was plated on the bottom of a 6-well

culture dish. After cell attachment, tissue culture inserts with 0.4- $\mu$ m pore size PET capillary membranes (ThinCert, Greiner bio-one, Courtaboeuf, France) were positioned onto the wells. The multidrug resistant MCF-7/DOXO variant was then plated on the membrane surface of the tissue culture inserts. Cells were co-incubated for 6 days. After each day, cells were trypsin-resuspended and mixed together before analysis by flow cytometry.

**RT-PCR**—Total RNA was extracted from either separately cultured MCF-7 and MCF-7/DOXO cells or MCF-7 after a 6-day co-incubation with MCF-7/DOXO in tissue culture inserts. The extractions were performed using the RNeasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations. After genomic DNA removal by DNase digestion (Turbo DNA free kit, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), total RNA (1  $\mu$ g) was reverse-transcribed with oligodT (Promega, Charbonnières, France) using the Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen). PCR analysis was performed with a MasterCycler apparatus (Eppendorf, Le Pecq, France) from 2  $\mu$ l of cDNA using both ABCB1 primers, *i.e.* hABCB1-F (5'-CTCCGATACATGGTTTTCG-3'), hABCB1-R (5'-CTCATGAGTTTATGTGCCACC-3'), and  $\beta$ -actin primers, *i.e.* h-actin-F (5'-GATGATGATATCGCCGCGCT-3') and h-actin-R (5'-CTTCTCGCGGTGGCCTTGG-3'). After an initial denaturation step at 94 °C for 2 min, 35 cycles were performed including a denaturation step at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s. The final extension step was continued for 5 min.  $\beta$ -Actin amplification was used as a qualitative control. DNA was omitted in non-template control. The absence of genomic DNA traces in RNA samples was checked by performing amplification from RNA without previous reverse transcription. PCR products were analyzed on a 1% agarose gel and visualized by SYBR staining (SYBR Safe DNA gel stain, Invitrogen). Amplicon length was evaluated using a standard molecular weight marker (100 bp DNA ladder, Promega).

**Statistical Analysis**—All quantitative data were expressed as the means  $\pm$  S.E. Statistical analysis was performed by using SigmaPlot 11 (Systat Software Inc., Chicago, IL). A Shapiro-Wilk normality test, with a  $p = 0.05$  rejection value, was used to test normal distribution of data before further analysis. All pairwise multiple comparisons were performed by one way analysis of variance followed by Holm-Sidak post hoc tests for data with normal distribution or by Kruskal-Wallis analysis of variance on ranks followed by Tukey post hoc tests in the case of failed normality test. Paired comparisons were performed by Student's *t* tests or by Mann-Whitney rank sum tests in the case of unequal variance or failed normality test. Statistical significance was accepted for  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), or  $p < 0.001$  (\*\*\*)

## RESULTS

**Transfers of P-gp in Co-cultures**—As in a previous work (26), to study P-gp transfers, drug-sensitive parental human breast cancer MCF-7 cells were mixed and co-cultured with an equivalent amount of multidrug-resistant P-gp overexpressing MCF-7 variants, selected for their resistance toward doxorubicin (MCF-7/DOXO). Surface P-gp expression was daily imaged

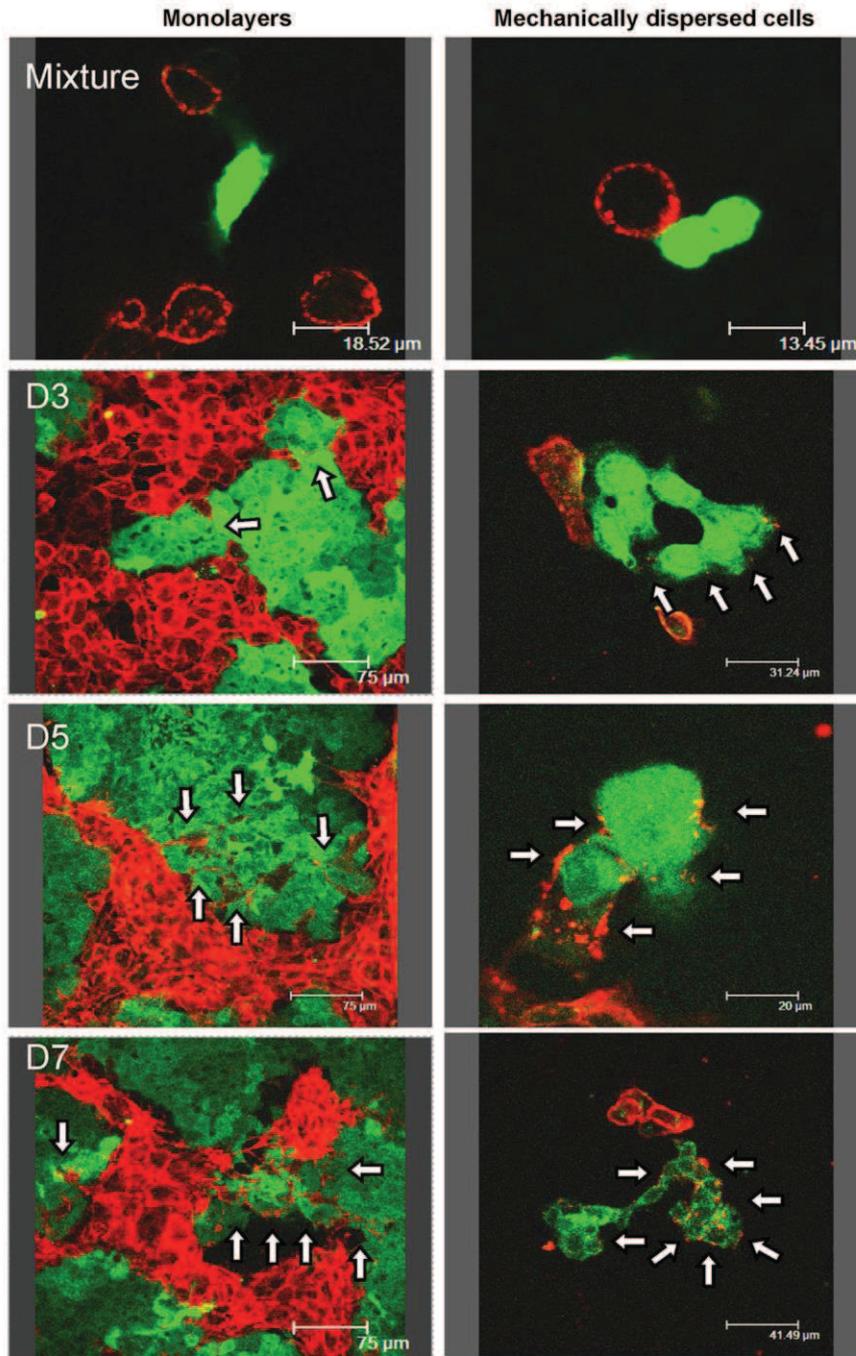


FIGURE 1. Direct immunodetection of P-gp transfers in co-cultures of sensitive (MCF-7) and resistant (MCF-7/Doxo) variants of the human breast cancer cell line. Before co-culture, MCF-7 were tagged with the persistent fluorescent probe CellTracker Green (ctgMCF-7). Mixtures of 50:50 ctgMCF-7:MCF-7/Doxo were co-cultured on glass coverslips during periods varying from 0 to 7 days (D0-D7). P-gp was immunodetected with phycoerythrin-conjugated (PE)-UIC2 mAb (red fluorescence) by confocal laser scanning microscopy in non-dispersed (left column) or mechanically dissociated cells (right column). Note that green fluorescence progressively fades because of dilution within daughter cells throughout mitoses. From D3 to D7, sensitive ctgMCF-7 show an increasing P-gp-specific red membrane staining (arrows), restricted to the plasma membrane, in non-dispersed as well as in dissociated cells.

by confocal microscopy after immunostaining with a phycoerythrin-conjugated UIC-2 monoclonal antibody directed against an extracellular epitope of P-gp (PE-UIC2 mAb). To be easily identified in co-cultures, the sensitive MCF-7 were tagged before seeding with the vital fluorescent tracer CellTracker Green (and, therefore, called ctgMCF-7). CtgMCF-7 and daughter ctgMCF-7 with inherited tracer can be easily

identified in the co-cultures over several days. As shown in Fig. 1, left, after 3 days of co-culture, a progressive P-gp-immunostaining appeared at the membrane of ctgMCF-7. The staining gradually intensified from day 3 to day 7 and also penetrated from boundary cells to cells lying deeper in inlets. P-gp immunofluorescence was clustered in small isolated bright spots in the early stages and then appeared more uniformly distributed

## Membrane Nanotubes and Microparticles Transfer P-gp in MCF-7

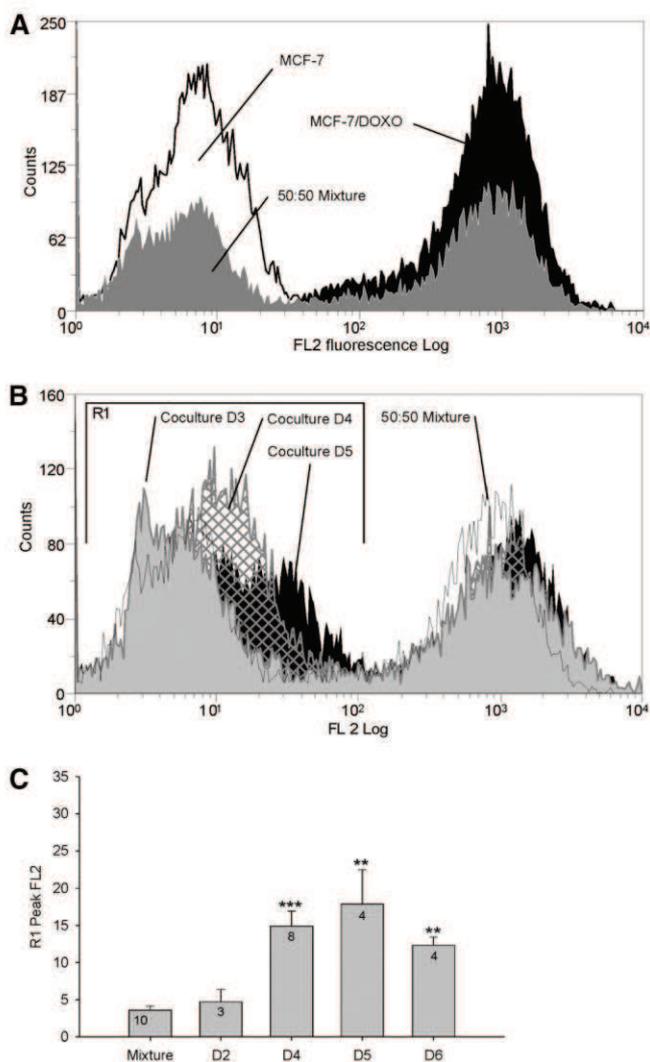
around ctgMCF-7 in older co-cultures. To make sure that what we interpreted as P-gp acquisition by ctgMCF-7 cells was not due to MCF-7/Doxo membrane expansions within ctgMCF-7 islets, experiments were repeated on cells mechanically dispersed just before imaging. Again, in these conditions a clear-cut P-gp staining restricted to plasma membrane was observed in isolated ctgMCF-7 (Fig. 1, right).

**Acquisition of P-gp and Efflux Activity by Sensitive MCF-7**—Co-culture experiments have been used to follow cell membrane P-gp contents over time, from day 0 to day 6, after staining with PE-UIC mAb and analysis by flow cytometry (Fig. 2). In Fig. 2B, a time-dependent shift of the peak corresponding to MCF-7 (in region R1) to the right, toward the regions of high P-gp levels, was observed. R1 peak fluorescence quantification showed a significant increase of FL2, from  $3.60 \pm 0.53$  at day 0 to  $17.90 \pm 4.56$  at day 5 of co-culture (Fig. 2C, mean  $\pm$  S.E.,  $n = 3-10$ , arbitrary fluorescence units).

To investigate whether P-gp transfers modify multidrug resistance activity of cell populations, the ability of co-cultures to efflux the P-gp fluorescent substrate calcein AM was followed over time. As shown in Fig. 3A, fluorescence accumulated in cells as an inverse function of P-gp activity, giving the possibility to separate fluorescent-sensitive MCF-7 from non-fluorescent resistant cells in a 50:50 extemporaneous mixture. In cells analyzed after co-culture, the peak of activity corresponding to initially sensitive cells (fluorescent region R2) progressively shifted to the left, toward regions of higher efflux activity. This observation is in good agreement with a progressive acquisition of P-gp. However, in addition to observations in analyses of cell membrane P-gp contents, the distribution in activity was characterized by the appearance of a third subpopulation displaying an intermediate efflux activity (in region R3). This new middle peak rose in amplitude with time. Concurrently, subpopulations of MCF-7 and, especially, of MCF-7/Doxo slightly decreased. At day 5 of co-culture, the cell count in R3 represented  $23.72 \pm 0.89\%$  (mean  $\pm$  S.E.,  $n = 14$ , black bars in Fig. 4D) of the total cell number, whereas cells with this intermediate fluorescence level constituted only  $11.29 \pm 0.30\%$  ( $n = 6$ ) in the extemporaneous mixture of 50:50 MCF-7:MCF-7/Doxo at day 0.

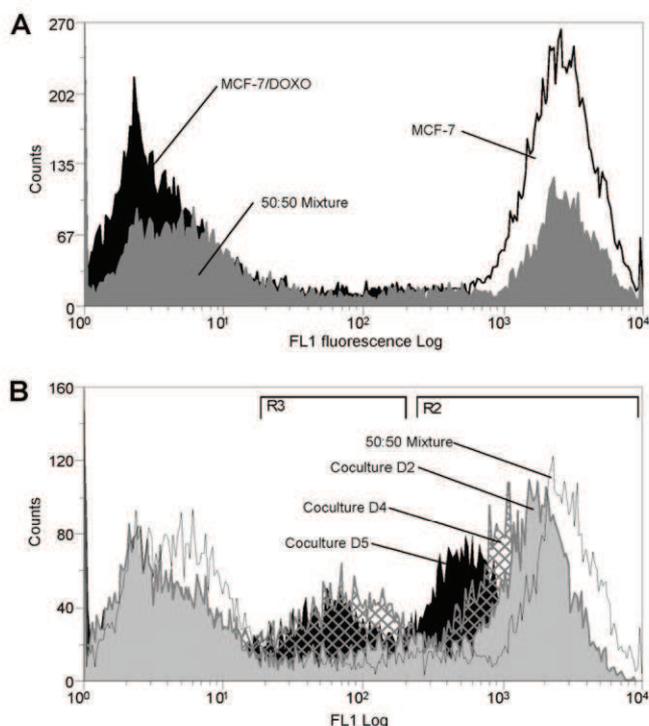
Although time-progressive acquisition of P-gp and efflux activity by sensitive cells in the presence of resistant variants can occur through intercellular P-gp transfers, a *de novo* expression of P-gp by MCF-7 may alternatively originate from *MDR1/ABC1* gene induction in response to various signaling factors secreted by co-cultures. To address this question, MCF-7 and MCF-7/Doxo were co-incubated in the same culture medium but separated by a permeable transwell membrane with a pore size of  $0.4 \mu\text{m}$ . This filter porosity enables free diffusion of soluble paracrine factors and submicrometric particles but prohibits any cell-to-cell contact.

As in co-cultures, in the presence of the separating membrane, fluorescence of sensitive cells in region R2 gradually shifted toward the region of higher efflux activity. By contrast, the third population did not appear in the region R3 of intermediate efflux activity (Fig. 4A, left). From Fig. 4C, acquisition of efflux activity in region R2 for MCF-7 co-cultured in contact ( $n = 14$ , black bars) with MCF-7/Doxo did not significantly



**FIGURE 2. Analysis by flow cytometry of P-gp transfers in co-cultures.** Membrane P-gp content was assessed by flow cytometry in the FL2 channel after direct immunolabeling with PE-UIC2. A, cell membrane P-gp content was quantified in parental MCF-7 (open black histogram), in resistant MCF-7/Doxo (solid black histogram), or in an extemporaneous mixture of 50:50 MCF-7:MCF-7/Doxo (solid gray histogram). B, membrane P-gp content was quantified in co-cultures. A 50:50 MCF-7:MCF-7/Doxo cell mixture was seeded on culture dishes at day 0 and trypsinized for increasing co-culture durations. P-gp distribution in an extemporaneous mixture of 50:50 MCF-7:MCF-7/Doxo was superimposed for comparison (open black histogram). Results obtained at days 3 (solid gray histogram), 4 (hatched histogram), and 5 (solid black histogram) show a progressive shift to the right of the peak initially corresponding to sensitive MCF-7 low P-gp expression. C, shown is a statistical comparison of the peak FL2 fluorescence in region R1 after different durations of co-culture (day D1 to D6), expressed as the mean  $\pm$  S.E. of the replicate numbers indicated in the bars. Results significantly different from the mixture are indicated (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ). The maximum P-gp transfer was observed at day 5.

differ from the gain of activity in MCF-7 co-incubated at distance ( $n = 7$ , gray bars) of resistant cells at days 4 and 5 ( $p \geq 0.042$ ) but was significantly higher at day 6 ( $p < 0.001$ ). The number of cells with intermediate efflux activity in region R3 was always rising and significantly higher in conditions of co-culture by comparison to transwell co-incubations at days 4, 5, and 6 (Fig. 4D). RT-PCR analysis of MCF-7 co-incubated at a distance from MCF-7/Doxo revealed that no significant pres-



**FIGURE 3. Analysis by flow cytometry of P-gp activity transfers in co-cultures.** P-gp activity was measured as the ability to efflux the fluorescent P-gp substrate calceinAM. Intracellular fluorescence accumulation was quantified by flow cytometry in the FL1 channel. **A**, P-gp activity was measured in parental MCF-7 cells (open black histogram), in resistant MCF-7/Doxo cells (solid black histogram), or in an extemporaneous mixture of 50:50 MCF-7:MCF-7/Doxo (solid gray histogram). **B**, P-gp activity was measured in co-cultures. A 50:50 MCF-7:MCF-7/Doxo cell mixture was seeded on culture dishes at day 0 and trypsinized after increasing co-culture durations. P-gp activity distribution in an extemporaneous mixture of 50:50 MCF-7:MCF-7/Doxo was superimposed for comparison (open black histogram). Results obtained at days 2 (solid gray histogram), 4 (hatched histogram), and 5 (solid black histogram) show a gradual shift to the left of the peak initially corresponding to sensitive MCF-7 low activity. In addition, a third population exhibiting a middle range P-gp activity progressively appears with time.

ence of *MDR1/ABC1* mRNA can be detected after 6 days of transwell experiment (Fig. 4B).

Taken together, these results confirm that MCF-7 acquired P-gp from MCF-7/Doxo without *MDR1/ABC1* induction. In the absence of any cell-to-cell contact, P-gp transfers persisted but appeared lower than in co-cultures. This suggests the occurrence of different mechanisms of transfer. P-gp may be extragenetically acquired by sensitive cells through intercellular contacts with MCF-7/Doxo that could also, concurrently, release P-gp cargo particles able to spread smaller amount of P-gp through 0.4- $\mu$ m pore size membranes. These points were investigated in the following experiments.

**Microparticles as Remote Mechanism of Transfer**—To isolate MPs from the culture medium of pre-confluent-resistant MCF-7, we used a two-step purification and centrifugation protocol (*cf.* “Experimental Procedures”). MPs detection was performed by flow cytometry. Because previous experiments evoked a diameter of less than 0.5  $\mu$ m for MPs, a size below the detection limit of the electronic volume channel of our flow cytometer, we used the light scattering properties of particles to distinguish MPs from background noise. In the representative

dot plots illustrated in Fig. 5A, the number of events associated to high side scatter signals was greater in the MP extract (*top middle panel*) than in control HBSS (*top left panel*). To increase MPs detection, membrane glycoconjugates in extracts were tagged by the lectin WGA conjugated to Alexa Fluor 594 before analysis in the FL1 channel. The huge number of detected events with both high fluorescence and scattering properties indicated the presence of MPs in MCF-7 (data not shown) and MCF-7/Doxo (*top right panel*) culture media.

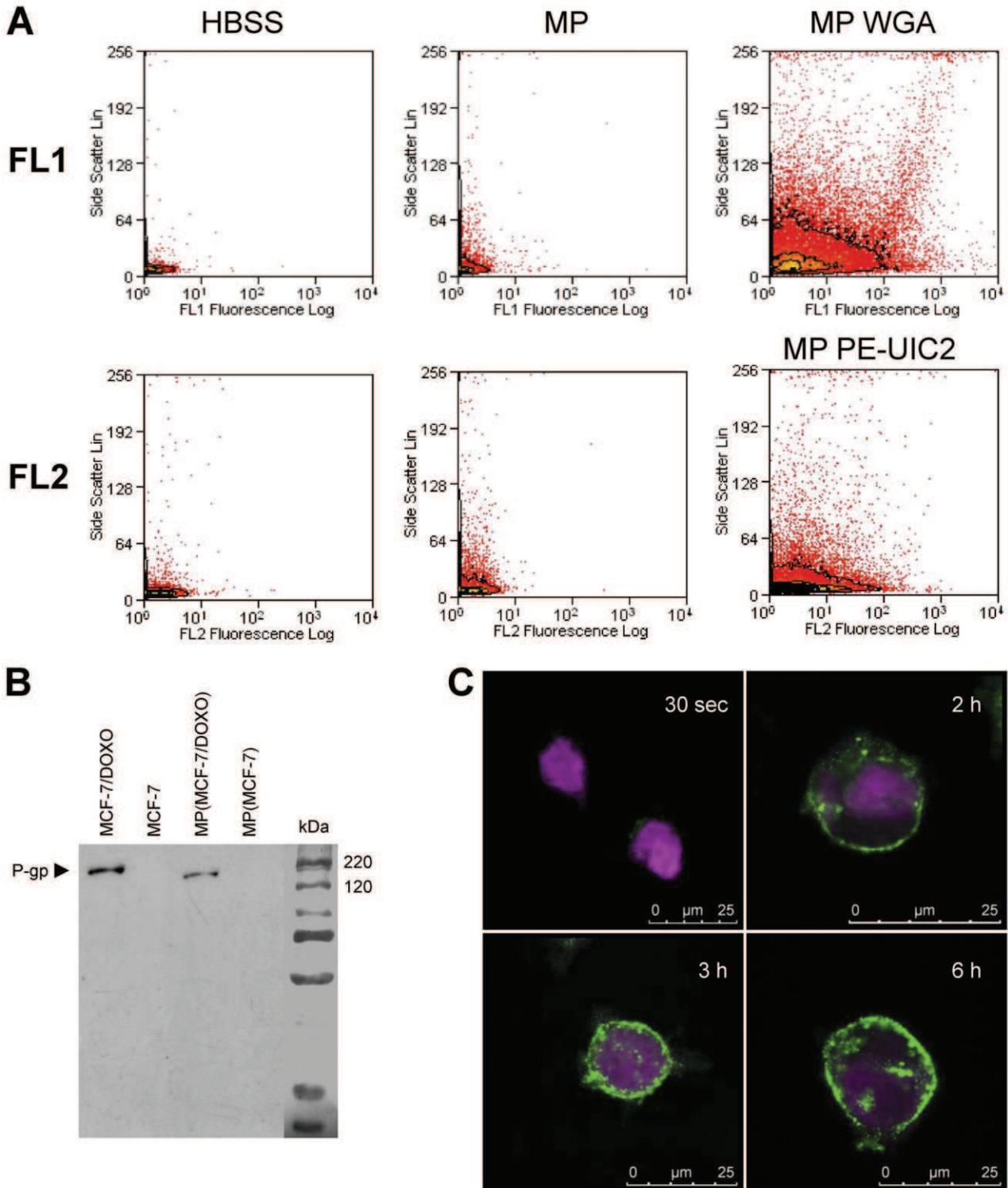
P-gp content of MPs was examined by using immunolabeling with different monoclonal antibodies. By flow cytometry, P-gp was detected in the membrane of MPs purified from MCF-7/Doxo culture medium after direct staining with PE-UIC2 mAb and analysis in the FL2 channel (Fig. 5A, *bottom right panel*). In Western blots, P-gp was detected in total proteins extracted from MCF-7/Doxo MPs after indirect staining by using c219 as primary mAb (Fig. 5B).

Binding capabilities of microparticles to sensitive MCF-7 were explored by confocal imaging of living cells labeled with CellTracker Violet and incubated with MCF-7/Doxo MPs tagged by Alexa Fluor 594-conjugated WGA. Fig. 5C shows a progressive transfer of green fluorescence to the membrane of sensitive MCF-7, increasing with time from 30 s to 6 h.

MPs-mediated P-gp transfers were studied in experiments in which sensitive MCF-7 cells were exposed to P-gp-containing MPs purified from MCF-7/Doxo culture medium and analyzed by flow cytometry. Before analysis, repeatability in control distribution of surface fluorescence after PE-UIC2 direct immunolabeling (Fig. 6A) or of whole cell fluorescence after calceinAM incubation (Fig. 6D) was verified in sensitive MCF-7 from 5 independent cultures.

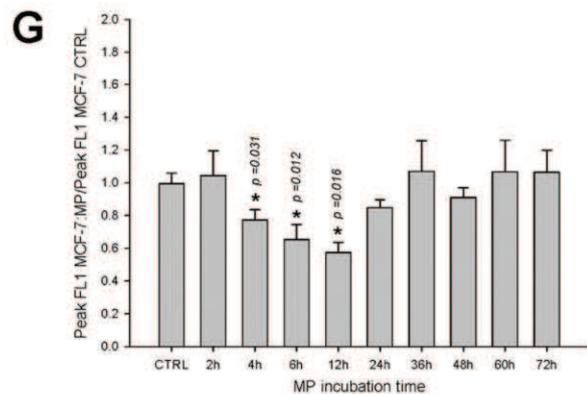
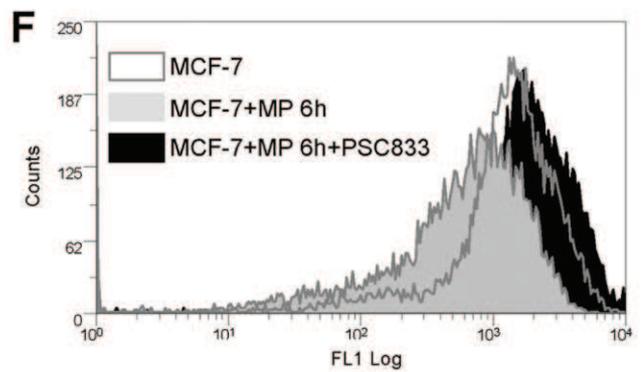
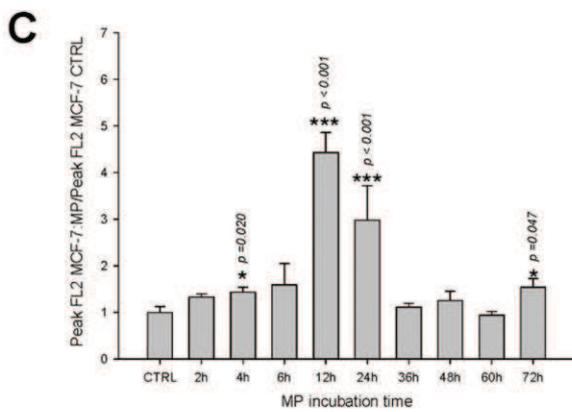
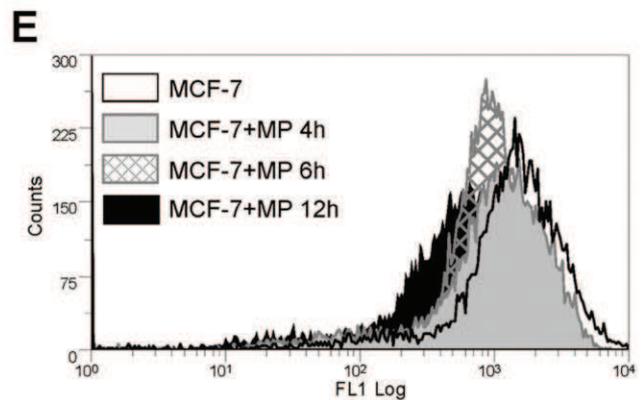
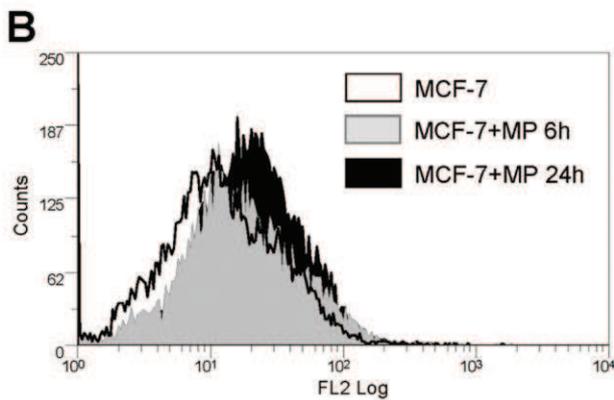
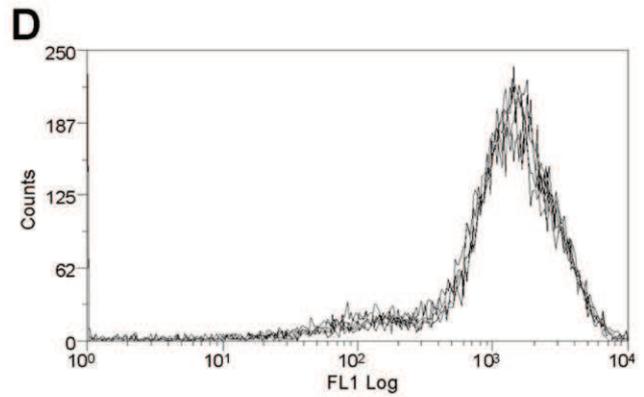
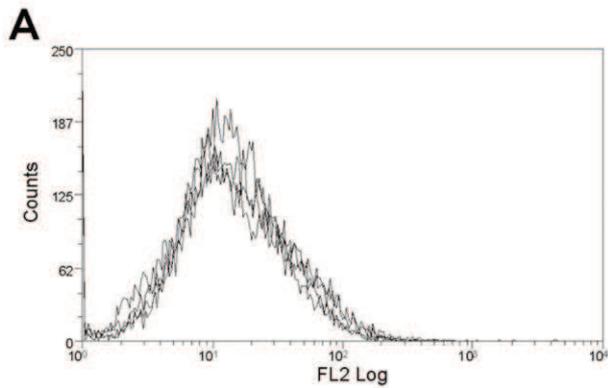
Incubation of sensitive MCF-7 with MCF-7/Doxo MPs transiently increased the relative cell surface expression of P-gp (Fig. 6B). A significant increase of surface P-gp was obtained as early as 4 h of incubation (Fig. 6C). Plasma membrane P-gp content peaked after 12 h of incubation, with a  $4.42 \pm 0.43$ -fold increase of fluorescence, and declined thereafter. Concomitantly, a significant efflux of calceinAM fluorescence was detected, also 2 h after the onset of exposure. Variations of efflux activity followed plasma membrane P-gp content, with a peak reached at 12 h, corresponding to a  $0.57 \pm 0.06$ -fold decrease of fluorescence and a subsequent fast return to the control fluorescence level (Fig. 6, E and G). To verify that the gain of efflux activity by parental MCF-7 was actually due to acquired P-gp activity, we used the archetypal non-competitive P-gp blocker PSC833, which fully inhibited P-gp-driven calcein efflux in MCF-7/Doxo (supplemental Fig. 1). After 6 h of exposure to MCF-7/Doxo MPs, efflux activity acquired by parental MCF-7 was completely abolished by 1  $\mu$ M PSC833 (Fig. 6F).

**Tunneling Nanotubes as Contact Mechanism of Transfer**—In 2004, a new way of cell-to-cell communication based on tunneling nanotubes was reported (30). These labile plasma membrane cell bridges, with high length to diameter ratios, are known to appear *de novo* between cells in culture and to mediate intercellular transfers of organelles, various plasma membrane components, and cytoplasmic molecules (31). The presence of TnTs and their role in P-gp transfers were investigated in co-cultures of MCF-7:MCF-7/Doxo.

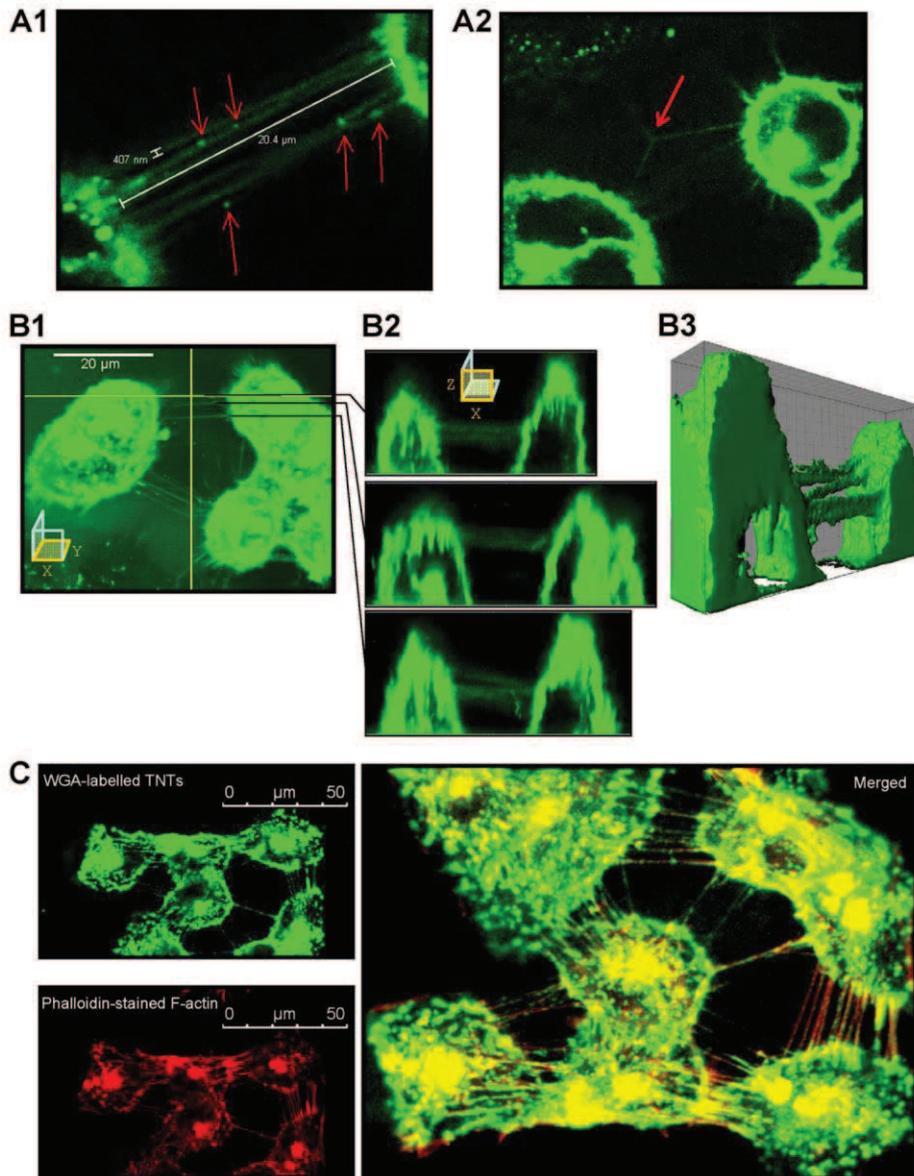


**FIGURE 5. Characterization of microparticles released by MCF-7/DOXO.** MPs were extracted and purified from MCF-7/DOXO cultures as described under "Experimental Procedures." *A*, MPs were detected in flow cytometry by their capability to diffract the laser light source and to give an increased side scatter signal (middle dot plots) by comparison to a sample of pure HBSS (left dot plots). Glycoconjugates in MP membranes were revealed with Alexa Fluor 594 conjugated-WGA and analyzed in the FL1 channel (top right dot plots). P-glycoprotein was detected in MPs by PE-UIC2 labeling in the FL2 channel (bottom right dot plots). *B*, total P-gp content of MPs was studied by Western blot using c219 as anti-P-gp primary mAb. P-gp was clearly detected in protein extracts from MCF-7/DOXO (lane 1) and from MPs extracted from MCF-7/DOXO cell cultures (lane 3) but not in extracts from MCF-7 (lane 2) and from MPs extracted from MCF-7 cell cultures. *C*, detection MP binding to MCF-7 cells is shown. CellTracker Violet-tagged MCF-7 cells were exposed to WGA-labeled MPs extracted from MCF-7/DOXO and imaged by confocal microscopy. Intensity of WGA labeling increased at the membrane of MCF-7 with time of incubation with MPs from 30 s to 6 h.

Membrane Nanotubes and Microparticles Transfer P-gp in MCF-7



Downloaded from www.jbc.org at Univ du Havre, on April 12, 2013



**FIGURE 7. Characterization of TnTs connecting MCF-7 cells in culture.** *A1*, Alexa Fluor 594 conjugated-WGA-stained MCF-7 cells were analyzed by live cell confocal microscopy. Cells are connected to surrounding cells by numerous ultrafine membrane extensions, namely TnTs, having a diameter inferior to  $0.5 \mu\text{m}$  and a length of up to one cell diameter. WGA-stained organelles are seen at several points in TnTs (*arrows*). *A2*, branched TnTs were rarely observed. *B1–B2*, some TnTs were selected for *x-z* sections. TnTs did not contact the substrate. *B3*, shown is a three-dimensional reconstruction. *C*, fixed MCF-7 cells were stained with WGA (*top left image*) and TRITC-phalloidin (*bottom left image*). The merged image displays colocalization of WGA and TRITC-phalloidin staining, indicating that F-actin is a major component of TnTs (*right image*).

Confocal images recorded after WGA labeling of living MCF-7 in culture revealed structures connecting cells and fulfilling TnT size criteria (Fig. 7A), with a typical width of less than  $0.5 \mu\text{m}$  and extensions over several cell diameters. Some TnTs exhibited punctual densities of fluorescence, which seems to correspond to the presence of subcellular organelles

**FIGURE 6. Transfers of P-gp and efflux activity to sensitive MCF-7 exposed to MPs extracted from MCF-7/DOXO.** *A*, repeatability of P-gp distributions in MCF-7, measured by flow cytometry after direct immunolabeling by PE-UIC2, is shown. Histograms from five independent cultures were superimposed. *B*, membrane P-gp content in MCF-7 (*open black histogram*) treated for 6 h (*solid gray histogram*) or for 24 h (*solid black histogram*) with MPs extracted from MCF-7/DOXO increased with time of exposure. *C*, relative increase of membrane P-gp content in MCF-7 cells treated with MPs extracted from MCF-7/DOXO was transient, significant after 4 h, and peaked after 12 h of exposure. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of  $n = 2–10$  replicates. *D*, repeatability of P-gp activity distributions in MCF-7, assessed by their ability to efflux intracellular fluorescence after loading with calceinAM, is shown. Histograms from five independent cultures are superimposed. *E*, P-gp activity in MCF-7 cells (*open black histogram*) treated for 4 h (*solid gray histogram*), 6 h (*hatched histogram*), or for 12 h (*solid black histogram*) with MPs extracted from MCF-7/DOXO increased with time. *F*, P-gp activity transferred to MCF-7 by a 6-h exposure to MPs extracted from MCF-7/DOXO was blocked by the specific P-gp antagonist PSC833 ( $20 \mu\text{M}$ ). *G*, relative increase of P-gp activity, expressed as a drop of intracellular fluorescence, in MCF-7 treated with MPs extracted from MCF-7/DOXO was transient, significant after 4 h, and peaked after 12 h of exposure. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E. of  $n = 2–10$  replicates. Results significantly different from control are indicated (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

## Membrane Nanotubes and Microparticles Transfer P-gp in MCF-7

(Fig. 7A1). Branched TnTs were rarely observed (Fig. 7A2). The main characteristic of TnTs is that they have no contact to the substratum and they hover in the extracellular medium (31). Selected (*x-z*) sections, obtained from confocal microscopy (Fig. 7, B1 and B2), and three-dimensional reconstructions (Fig. 7B3 and supplementary video) allowed identification of suspended TnTs interconnecting living MCF-7 cells. Co-localization of actin microfilaments, probed with tetramethylrhodamine isothiocyanate-phalloidin, and TnTs membranes, revealed by Alexa 594-WGA, were systematically observed in double staining experiments carried out in fixed MCF-7 (Fig. 7C). Confocal images presented herein correspond to 4-day-old cell cultures. TnTs were never observed in cells cultures having less than 3 days of incubation (data not shown).

The role of TnTs in intercellular P-gp transfers was explored by using live cell confocal microscopy and multiple staining co-cultures of 50:50 MCF-7:MCF-7/Doxo. In these experiments, parental-sensitive MCF-7 cells were tagged with CellTracker Violet as a vital fluorescent dye before seeding. After several days of co-culture, cells were incubated with Alexa 594-WGA to reveal TnTs membranes. In addition, P-gp was immunodetected by using UIC2 as the primary mAb. As shown by the representative merged images presented in Fig. 8, co-localization of the three dyes were found on many slides obtained at the third and fourth days of co-culture. P-gp-containing membrane bridges were frequently observed between MCF-7/Doxo and parental non-P-gp-expressing MCF-7. The anti-P-gp immunostaining always extended over the whole length of the TnTs. Nevertheless, in some sections of TnTs, an intense immunoreactivity appeared as aggregated strings. On many CellTracker Violet-identified parental MCF-7, P-gp was localized at the implantation point of TnTs and also on adjacent areas of the cell membrane, with an immunostaining intensity vanishing according to the distance.

### DISCUSSION

In this work we give evidence for the existence of concurrent pathways in the transfer of functional P-gp from drug-resistant to drug-sensitive cancer cells. Previous studies have proposed that cell-to-cell P-gp transfers involved either cell contacts between adherent cells (23, 24) or were mediated by membrane microparticle release in liquid tumors (25). For the first time we establish that both cell-derived microparticles and membrane nanotubes carrying P-gp between neighboring cells contribute to the transfer in MCF-7 cell lines.

From our experiments, spontaneous induction of the *MDR1/ABCBI* gene leading to expression of P-gp was never observed in pure parental MCF-7 cultured in the absence of cytotoxics. Herein, we report that a progressive membrane P-gp immunostaining associated to a calcein efflux activity was detected in these cells after 2–6 days of co-culture with their drug-resistant P-gp-overexpressing counterpart. This observation may thus correspond to P-gp acquisition by transfer from resistant donor cells to sensitive recipient ones, as described earlier (23–26). However, the presence of resistant MCF-7/Doxo in the culture dish constitutes a modification of the cell environment that could provoke an increase in gene transcription. In particular, secretion of soluble factors able to induce *MDR1/ABCBI* has to

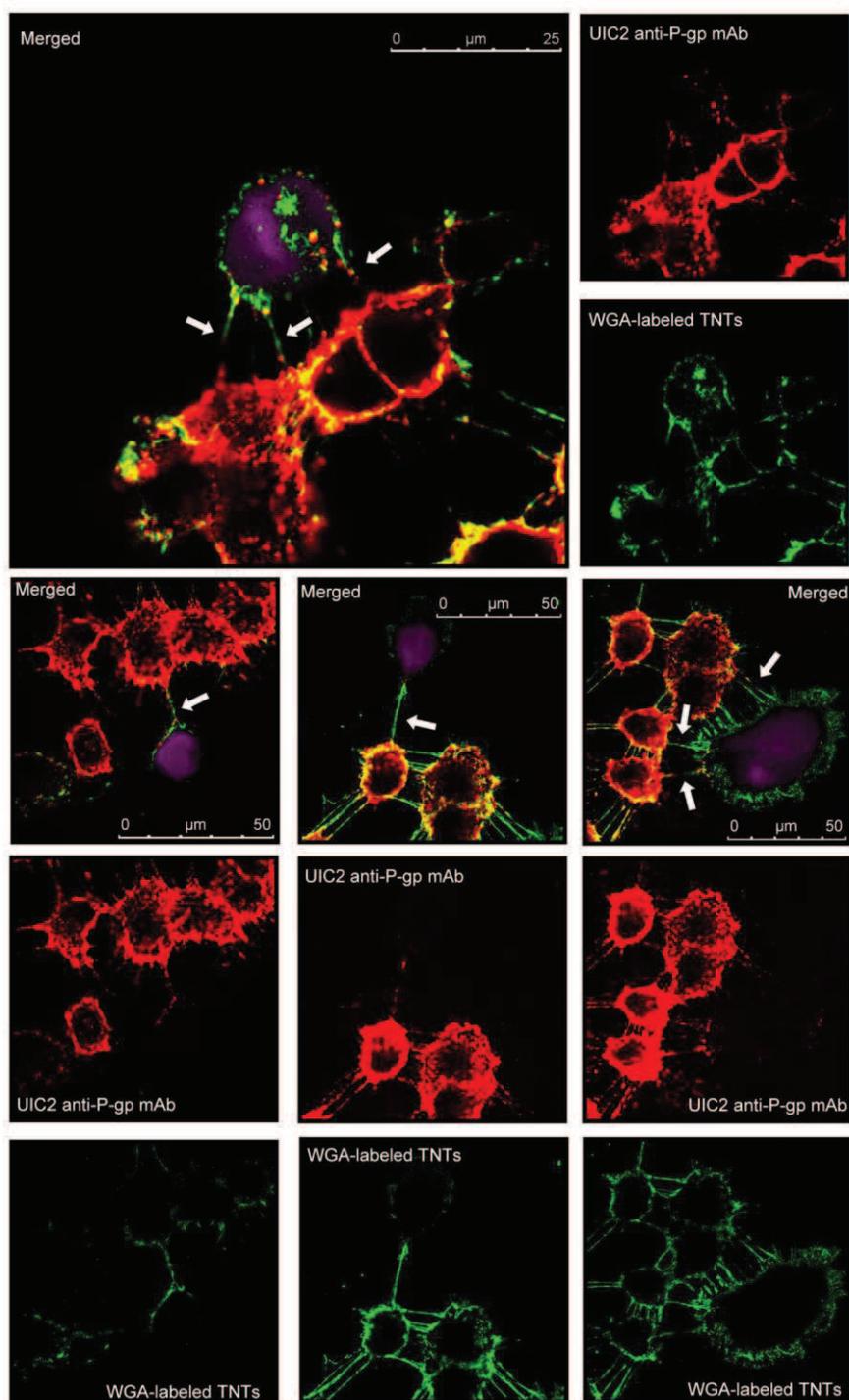
be considered. Co-incubation experiments involving parental MCF-7 physically separated from resistant MCF-7/Doxo by transwell membranes with 0.4  $\mu\text{m}$  pores were designed to address this issue. In these conditions, our results indicate that sensitive MCF-7 again acquired P-gp without *MDR1/ABCBI* induction, as revealed by the absence of P-gp transcript detection after MCF-7 RT-PCR analysis. These data lead us to conclude that the gain of P-gp by parental MCF-7 was dependent on cell-to-cell P-gp transfers that did not require proximity. The mechanism of transfer may thus involve diffusible intercellular cargos with, typically, a submicron size.

Interestingly, however, for long term 4–6-day experiments corresponding to the peak of membrane P-gp gain by MCF-7, we observed different quantities of efflux activity acquisition depending on whether sensitive and resistant cells were unconnectedly co-incubated or intimately co-cultured. Co-incubations led simply to a uniform shift of the sensitive cell population toward low levels of activity. By contrast, in the case of co-cultures allowing both remote and contact transfers, the acquisition of P-gp activity was characterized by a concurrent gain of low (R2 shift) and intermediate level (R3 increase) of calcein efflux.

The search for elements explaining additional gains of P-gp activity (typically in region R3), meeting the specific conditions of transfer with delay and contact has motivated confocal microscopy on living cells. Images revealed the occurrence of thin membrane bridges between neighboring cells. These high length-to-diameter ratio structures appeared to match the previously reported characteristics of tunneling nanotubes (for review, see Refs. 32 and 31), *i.e.* extending from cell to cell with no contact to substratum and filled with actin cytoskeleton. In several cell lines, TnTs have been shown to support cell-to-cell transfer of lipid anchored proteins (30). In this study, immunolabelings we obtained patently indicate that large membrane intrinsic glycoproteins such as P-gp can also travel between cells without leaving the lipid bilayer by diffusing laterally along the membrane of TnTs. Patchy or raft-like staining patterns likely corresponded to P-gp clusters, as this protein is known to alter local properties of lipid leaflets and to promote its own aggregation (33). The delay necessary to establish TnT connections as well as the cell proliferation needed for sufficient space-filling to bring MCF-7 cell bodies close enough may explain the latency separating the culture inoculation at day 0 and the detection of cells transferred in region R3 at day 3 in our experimental conditions. Further experiments are needed to determine whether TnT formation is based on outgrowth of filopodia protrusions under chemotactic guidance or rather on persistence of membrane bridges after separation of attached cells (31). Time-lapse imaging would also help to understand and to quantify time course and half-life of membrane bridge establishment in a dynamic environment governed by cell shape changes, migration, and growth.

As described for cell lines cultured in suspension (25), we found that resistant MCF-7 cells also spread P-gp-containing particles of micro- or submicrometric size in the culture medium. These microparticles can be detected after staining with the membrane specific WGA fluorescent dye. Incubation of sensitive MCF-7 with purified fluorescent MPs induced a

## Membrane Nanotubes and Microparticles Transfer P-gp in MCF-7



**FIGURE 8. Immunodetection of P-gp in TnTs connecting MCF-7/Doxo to MCF-7.** Sensitive MCF-7 were tagged with CellTracker Violet (ctvMCF-7, violet fluorescence), before co-culture. Mixtures of 50:50 ctvMCF-7:MCF-7/Doxo were co-cultured during 4 days on glass coverslips. P-gp was detected in fixed cells by using a non-conjugated UIC2 mAb as primary anti-P-gp mAb, revealed with a Texas Red-conjugated anti-mouse IgG2a  $\gamma$ 2a (red fluorescence), and TnTs were labeled with WGA (green fluorescence). The figure presents different images of P-gp and TnTs localization within the co-cultures. Merged images present P-gp-containing TnTs connecting resistant MCF-7/Doxo to parental ctvMCF-7 cells (arrows).

transfer of fluorescence to the cell membrane in less than 2 h. This observation was interpreted as binding and fusion of MPs to cell membrane.

Exposure of sensitive cells to MPs purified from resistant MCF-7 induced a significant increase of membrane P-gp con-

centration and efflux activity detectable after a short interval of 4 h. This delay is compatible with the time range of MPs binding to cell membrane. This small time range is, however, likely not sufficient to provoke P-gp expression from *MDR1/ABCB1* gene induction, a process requiring 8–96 h in most cells (34–36).

## Membrane Nanotubes and Microparticles Transfer P-gp in MCF-7

Our findings are consistent with a past study reporting that a significant degree of resistance to doxorubicin can be transiently transferred to sensitive cells by polyethylene glycol-induced fusion with P-gp isolated from cell membrane of highly resistant cells (37).

All together, these results indicate that sensitive cells incorporate sufficient amounts of MPs-conveyed P-gp in correct functional orientation to exhibit an increased efflux activity. This amount could, however, be reduced (with a partition between P-gp correctly and incorrectly inserted in the membrane) by contrast to direct transfer mediated by TnTs. This assumption may provide an explanation for the differences observed in acquired activities according to the mode of transfer with, in both cases, similar gains in P-glycoprotein.

The exact nature of MPs detected and purified in this work was not determined (for a review on this concern, see Ref. 38); even so, a release of exosomes by MCF-7 has been shown (39). Excepting our study and the article of Bebawy *et al.* (25), P-gp was not previously identified in the proteome analysis of exosomes (40). However, another ABC transporter, the MRP2 protein, has been found in exosomes isolated from ovarian carcinoma cells (41).

The time-dependence study of MP-mediated P-gp transfers without MP renewal in the culture medium gave bell-shaped kinetics, with gains of protein and activity peaking after 12 h of incubation and dropping thereafter to control levels. This transient transfer capability of purified MPs was probably linked to a combination of particle lability in the incubation medium and processes of internalization/degradation of membrane transferred P-gp by recipient cells. The time-course of P-gp and efflux activity decrease in MP-transferred MCF-7 is consistent with the half-life of 12 h estimated for this protein (42) and rapid losses of membrane P-gp and activity, within minutes to hours, recently reported (43, 44).

The findings described above reveal the occurrence of multiple routes for extragenetic MDR acquisition by cell lines. In addition to genetic and epigenetic *MDR1/ABCB1* regulations, intercellular trafficking of the resistance protein contributes to spread the phenotype among neighboring cells, pushing boundaries for gene expression beyond the cell limit. Further studies are needed to establish whether the cell interconnections by TnTs, the release of MPs, and the addressing of P-gp to the corresponding membrane systems are regulated processes. However, our study highly suggests that these expression pathways take place at different times and distance scales in the cell microenvironment.

*Acknowledgment*—We are indebted to Pr. Jean-Pierre Marie (Hôtel Dieu, Paris, France) for providing MCF-7/Doxo and PSC833.

### REFERENCES

1. Juliano, R. L., and Ling, V. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **455**, 152–162
2. Pastan, I., and Gottesman, M. (1987) Multiple-drug resistance in human cancer. *N. Engl. J. Med.* **316**, 1388–1393
3. Ambudkar, S. V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E., and Gottesman, M. M. (2003) P-glycoprotein. From genomics to mechanism. *Oncogene* **22**, 7468–7485
4. Seelig, A., and Landwojtowicz, E. (2000) Structure-activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers. *Eur. J. Pharm. Sci.* **12**, 31–40
5. Rosenberg, M. F., Callaghan, R., Modok, S., Higgins, C. F., and Ford, R. C. (2005) Three-dimensional structure of P-glycoprotein. The transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state. *J. Biol. Chem.* **280**, 2857–2862
6. Zhou, S. F. (2008) Structure, function, and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* **38**, 802–832
7. Klimecki, W. T., Futscher, B. W., Grogan, T. M., and Dalton, W. S. (1994) P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood* **83**, 2451–2458
8. Leslie, E. M., Deeley, R. G., and Cole, S. P. (2005) Multidrug resistance proteins. Role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **204**, 216–237
9. Mizutani, T., Masuda, M., Nakai, E., Furumiya, K., Togawa, H., Nakamura, Y., Kawai, Y., Nakahira, K., Shinkai, S., and Takahashi, K. (2008) Genuine functions of P-glycoprotein (ABCB1). *Curr. Drug Metab.* **9**, 167–174
10. Goldstein, L. J., Galski, H., Fojo, A., Willingham, M., Lai, S. L., Gazdar, A., Pirker, R., Green, A., Crist, W., and Brodeur, G. M. (1989) Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 116–124
11. Leighton, J. C., Jr., and Goldstein, L. J. (1995) P-glycoprotein in adult solid tumors. Expression and prognostic significance. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **9**, 251–273
12. Choi, C. H., Kim, H. S., Rha, H. S., Jeong, J. H., Park, Y. H., Min, Y. D., Kee, K. H., and Lim, D. Y. (1999) Drug concentration-dependent expression of multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein in the doxorubicin-resistant acute myelogenous leukemia sublines. *Mol. Cells* **9**, 314–319
13. Nieth, C., and Lage, H. (2005) Induction of the ABC-transporters Mdr1/P-gp (Abcb1), mrpl (Abcc1), and bcpr (Abcg2) during establishment of multidrug resistance after exposure to mitoxantrone. *J. Chemother.* **17**, 215–223
14. Meesungnoen, J., Jay-Gerin, J. P., and Mankhetkorn, S. (2002) Relation between MDR1 mRNA levels, resistance factor, and the efficiency of P-glycoprotein-mediated efflux of pirarubicin in multidrug-resistant K562 sublines. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **80**, 1054–1063
15. Riordan, J. R., Deuchars, K., Kartner, N., Alon, N., Trent, J., and Ling, V. (1985) Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* **316**, 817–819
16. Synold, T. W., Dussault, I., and Forman, B. M. (2001) The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat. Med.* **7**, 584–590
17. Baker, E. K., Johnstone, R. W., Zalberg, J. R., and El-Osta, A. (2005) Epigenetic changes to the MDR1 locus in response to chemotherapeutic drugs. *Oncogene* **24**, 8061–8075
18. Chekhun, V. F., Kulik, G. I., Yurchenko, O. V., Tryndyak, V. P., Todor, I. N., Luniv, L. S., Tregubova, N. A., Pryzimirskaya, T. V., Montgomery, B., Rusetskaya, N. V., and Pogribny, I. P. (2006) Role of DNA hypomethylation in the development of the resistance to doxorubicin in human MCF-7 breast adenocarcinoma cells. *Cancer Lett.* **231**, 87–93
19. Kovalchuk, O., Filkowski, J., Meservy, J., Ilnytsky, Y., Tryndyak, V. P., Chekhun, V. F., and Pogribny, I. P. (2008) Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 2152–2159
20. Reed, K., Hembruff, S. L., Laberge, M. L., Villeneuve, D. J., Côté, G. B., and Parissenti, A. M. (2008) Hypermethylation of the ABCB1 downstream gene promoter accompanies ABCB1 gene amplification and increased expression in docetaxel-resistant MCF-7 breast tumor cells. *Epigenetics* **3**, 270–280
21. Fojo, T. (2007) Multiple paths to a drug resistance phenotype. Mutations, translocations, deletions, and amplification of coding genes or promoter regions, epigenetic changes, and microRNAs. *Drug Resist. Updat.* **10**, 59–67
22. Callaghan, R., Crowley, E., Potter, S., and Kerr, I. D. (2008) P-glycoprotein. So many ways to turn it on. *J. Clin. Pharmacol.* **48**, 365–378
23. Levchenko, A., Mehta, B. M., Niu, X., Kang, G., Villafania, L., Way, D.,

## Membrane Nanotubes and Microparticles Transfer P-gp in MCF-7

- Polycarpe, D., Sadelain, M., and Larson, S. M. (2005) Intercellular transfer of P-glycoprotein mediates acquired multidrug resistance in tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 1933–1938
24. Rafii, A., Mirshahi, P., Poupot, M., Faussat, A. M., Simon, A., Ducros, E., Mery, E., Couderc, B., Lis, R., Capdet, J., Bergalet, J., Querleu, D., Dagonnet, F., Fournié, J. J., Marie, J. P., Pujade-Lauraine, E., Favre, G., Soria, J., and Mirshahi, M. (2008) Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumors. *PLoS One* **3**, e3894
25. Bebawy, M., Combes, V., Lee, E., Jaiswal, R., Gong, J., Bonhoure, A., and Grau, G. E. (2009) Membrane microparticles mediate transfer of P-glycoprotein to drug sensitive cancer cells. *Leukemia* **23**, 1643–1649
26. Pasquier, J., Magal, P., Boulangé-Lecomte, C., Webb, G., and Le Foll, F. (2011) Consequences of cell-to-cell P-glycoprotein transfer on acquired multidrug resistance in breast cancer. A cell population dynamics model. *Biol. Direct* **6**, 5
27. Marin, M., Poret, A., Maillet, G., Le Boulenger, F., and Le Foll, F. (2005) Regulation of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channels in multidrug-resistant MCF7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**, 1266–1278
28. Shedden, K., Xie, X. T., Chandaroy, P., Chang, Y. T., and Rosania, G. R. (2003) Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells. Association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res.* **63**, 4331–4337
29. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **30**, 3.22.1–3.22.29
30. Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., and Gerdes, H. H. (2004) Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* **303**, 1007–1010
31. Gurke, S., Barroso, J. F., and Gerdes, H. H. (2008) The art of cellular communication. Tunneling nanotubes bridge the divide. *Histochem Cell Biol.* **129**, 539–550
32. Gerdes, H. H., and Carvalho, R. N. (2008) Intercellular transfer mediated by tunneling nanotubes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 470–475
33. Oleinikov, V. A., Fleury, F., Ianoul, A., Zaitsev, S., and Nabiev, I. (2006) P-glycoprotein effect on the properties of its natural lipid environment probed by Raman spectroscopy and Langmuir-Blodgett technique. *FEBS Lett.* **580**, 4953–4958
34. Demeule, M., Brossard, M., and Béliveau, R. (1999) Cisplatin induces renal expression of P-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter. *Am. J. Physiol.* **277**, F832–F840
35. Geick, A., Eichelbaum, M., and Burk, O. (2001) Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J. Biol. Chem.* **276**, 14581–14587
36. Pajic, M., Bebawy, M., Hoskins, J. M., Roufogalis, B. D., and Rivory, L. P. (2004) Effect of short term morphine exposure on P-glycoprotein expression and activity in cancer cell lines. *Oncol. Rep.* **11**, 1091–1095
37. Belli, J. A., Zhang, Y., and Fritz, P. (1990) Transfer of adriamycin resistance by fusion of Mr 170,000 P-glycoprotein to the plasma membrane of sensitive cells. *Cancer Res.* **50**, 2191–2197
38. Théry, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 581–593
39. Staubach, S., Razawi, H., and Hanisch, F. G. (2009) Proteomics of MUC1-containing lipid rafts from plasma membranes and exosomes of human breast carcinoma cells MCF-7. *Proteomics* **9**, 2820–2835
40. Simpson, R. J., Jensen, S. S., and Lim, J. W. (2008) Proteomic profiling of exosomes. Current perspectives. *Proteomics* **8**, 4083–4099
41. Safaei, R., Larson, B. J., Cheng, T. C., Gibson, M. A., Otani, S., Naerdemann, W., and Howell, S. B. (2005) Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 1595–1604
42. Gottesman, M. M., Hrycyna, C. A., Schoenlein, P. V., Germann, U. A., and Pastan, I. (1995) Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Genet.* **29**, 607–649
43. Hawkins, B. T., Sykes, D. B., and Miller, D. S. (2010) Rapid, reversible modulation of blood-brain barrier P-glycoprotein transport activity by vascular endothelial growth factor. *J. Neurosci.* **30**, 1417–1425
44. Hawkins, B. T., Rigor, R. R., and Miller, D. S. (2010) Rapid loss of blood-brain barrier P-glycoprotein activity through transporter internalization demonstrated using a novel *in situ* proteolysis protection assay. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **30**, 1593–1597



## P-glycoprotein-activity measurements in multidrug resistant cell lines: single-cell *versus* single-well populational fluorescence methods

Pasquier, J., Rioult, D., Abu-Kaoud, N., Marie, S., Rafii, A., Guerrouahen, B. & Le Foll, F.

(2013)

**Introduction.** L'expression de la P-gp est responsable de l'efflux des médicaments chimiothérapeutiques contre les cancers humains aboutissant à la multirésistance (MDR). Différentes techniques basées sur la fluorescence ont été utilisées pour mesurer l'activité de la P-gp. Dans cet article, nous comparons deux approches couramment utilisées et abordables par les laboratoires: le lecteur de microplaques (MPR) et la cytométrie en flux pour détecter l'activité d'efflux de la calcéine-AM par la P-gp.

**Résultat.** La sélectivité, la sensibilité et la reproductibilité des deux méthodes ont été définies. Nos résultats ont montré que le MPR est plus puissant pour la détection de petite inhibition, mais la méthode de cytométrie en flux est plus fiable à des concentrations d'inhibiteurs plus élevées. Nous avons montré que, pour déterminer précisément l'efficacité de l'inhibition, le cytomètre en flux est de meilleure qualité et donne des valeurs correctes pour l'Emax et l'EC50, ce qui n'est pas le cas avec le MPR.

**Conclusion.** Les deux techniques peuvent potentiellement être largement utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour le criblage de médicaments à haut débit et dans les laboratoires de recherche universitaire pour le suivi de l'efflux dans des tests spécifiques.

*BioMed Research International*  
*Volume 2013, Article ID 676845, 11 pages*

doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/676845>



## Research Article

# P-Glycoprotein-Activity Measurements in Multidrug Resistant Cell Lines: Single-Cell versus Single-Well Population Fluorescence Methods

Jennifer Pasquier,<sup>1,2,3</sup> Damien Rioult,<sup>1</sup> Nadine Abu-Kaoud,<sup>3</sup> Sabine Marie,<sup>1</sup> Arash Rafii,<sup>2,3</sup> Bella S. Guerrouahen,<sup>2,3</sup> and Frank Le Foll<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Ecotoxicology UPRES EA 3222, IFRMP 23, University of Le Havre, 76058 Le Havre Cedex, France

<sup>2</sup>Department of Genetic Medicine, Weill Cornell Medical College, New York, NY 10022, USA

<sup>3</sup>Stem Cell and Microenvironment Laboratory, Weill Cornell Medical College in Qatar, Doha 24144, Qatar

Correspondence should be addressed to Jennifer Pasquier; jep2026@qatar-med.cornell.edu

Received 17 June 2013; Accepted 29 September 2013

Academic Editor: Beric Henderson

Copyright © 2013 Jennifer Pasquier et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Background.** P-gp expression has been linked to the efflux of chemotherapeutic drugs in human cancers leading to multidrug resistance. Fluorescence techniques have been widely applied to measure the P-gp activity. In this paper, there is a comparison between the advantages of two fluorescence approaches of commonly available and affordable instruments: the microplate reader (MPR) and the flow cytometer to detect the P-gp efflux activity using calcein-AM. **Results.** The selectivity, sensibility, and reproducibility of the two methods have been defined. Our results showed that the MPR is more powerful for the detection of small inhibition, whereas the flow cytometry method is more reliable at higher concentrations of the inhibitors. We showed that to determine precisely the inhibition efficacy the flow cytometry is better; hence, to get the correct  $E_{max}$  and  $EC_{50}$  values, we cannot only rely on the MPR. **Conclusion.** Both techniques can potentially be used extensively in the pharmaceutical industry for high-throughput drug screening and in biology laboratories for academic research, monitoring the P-gp efflux in specific assays.

## 1. Background

Development of chemoresistance by cancer cells is a major burden in cancer treatment. Tumor resistance to specific treatment could result from (i) interaction with the host [1] or (ii) genetic or epigenetic alterations of malignant cells [2]. Resistance may be innate or acquired during treatment. In some patients, prolonged exposure to a single agent may lead to resistance to multiple other structurally unrelated antineoplastic drugs, a phenotype early defined as Multidrug Resistance (MDR) [3]. MDR has been closely related to overexpression of a membrane-associated 170-kD transmembrane glycoprotein, P-glycoprotein (P-gp), which appears to play a key role in drug efflux [4, 5]. P-gp is a member of a highly conserved superfamily of ATP-binding cassette (ABC) transport proteins that actively pump out of the cell many potentially endogenous and exogenous

toxic compounds [6–8], collectively called P-gp allocrites [9]. P-glycoprotein is therefore considered as a biomarker for drug resistance [10]. Detection of P-gp-positive cells within tumors have been carried out by various techniques [11] such as determination of ABCB1 transcript levels by RT-PCR [12] and protein expression by immunocytochemistry [13]. However, a better correlation between cell resistance factor and presence of P-gp was obtained in functional assays where cell efflux capability is quantified by using a P-gp fluorescent allocrite [14, 15]. Direct measurement of P-gp activity offers a better level of functional integration, taking into account posttranscriptional and extragenetic regulations of efflux-based resistance to cytotoxics [16]. It then becomes mandatory to accurately evaluate P-gp activity in order to assess its role in the occurrence of chemoresistance.

Calcein acetoxymethyl ester (calcein-AM) is a nonfluorescent, highly lipid soluble dye that passively crosses plasma

membranes. Calcein-AM is widely used to quantify MDR efflux activity, as this molecule behaves as an allocrite for several ABC transporters, namely, ABCB/P-gp and ABCC/MRP (Multidrug Related Protein) pumps [17, 18]. Once inside the cell, ester bonds are cleaved by endogenous esterase, transforming calcein-AM into a hydrophilic and intensely fluorescent calcein, which is well retained in the cytosol. MDR cells expressing high levels of P-gp rapidly extrude nonfluorescent calcein-AM from the plasma membrane, reducing accumulation of fluorescent calcein in the cytosol. As a result, fluorescence intensity is inversely related to P-gp activity.

The calcein fluorescence level can be measured by a fluorometer, often a microplate reader (MPR), assessing the fluorescence as a whole (cultures isolated from biological samples) [19] or cell by cell using a flow cytometer [20]. However, influence of the measuring approach onto the deduced mean cell fluorescence or onto the reconstituted cell fluorescence distribution in the analyzed population is often not considered. Herein, we have compared well-fluorescence and cell-fluorescence methods in drug-resistant human MCF-7 and Hs578T cell lines in order to understand better how variations of cell fluorescence intensity can affect the signals given by the instruments.

## 2. Results

The P-glycoprotein activity was assessed by using fluorogenic dye calcein-AM, as a substrate for efflux of P-gp. As a result, calcein fluorescence is inversely proportional to P-gp activity. Two methods (flow cytometry and microplate reader) have been optimized to measure the effect of a competitive (VRP) and a noncompetitive (PSC833) P-gp inhibitor on the calcein accumulation in two parental breast cancer cells lines, and their resistant variants MCF-7/Doxo (Figure 1(a)) and Hs578T/Doxo (Figure 1(b)). In this study we compared these two approaches in order to assess their sensitivity and specificity for P-gp detection in accumulation and retention assays. Ten experiments have been performed for each condition. One experiment consists in 6 replicates in microplate reader and a sample of 10,000 cells using a flow cytometer.

**2.1. Quantifications of the Calcein AM Fluorescence in a Single Well Microplate Reader versus Single Cell.** First, we determined with microplate reader the effect of VRP and PSC833 P-gp inhibitor on the intracellular trapping of calcein (Figure 1). Then, we adapted the microplate reader method with few modifications to increase its sensitivity. This gives us a global fluorescence of the well without taking into account the cell number. To overcome this issue, we decided to carry out MTT assays, to take into consideration the heterogeneity in the cell number distribution while setting up the experiment. We generated an OD/MTT scale by reading a known number of cells after MTT ( $n = 6$ ). We generated an MTT calibration curve for each cell line which can fit by a classical enzymatic curve (MCF-7/Doxo  $r^2 = 0.9773$ ; Hs578T/Doxo  $r^2 = 0.9840$ ). MTT OD was between 0.2 and

0.8, consequently in the linear part of the curve, allowing us to determine the cell number. It is interesting to note that the cells number gave an ODmax/2 at a value of 175000 cells/well for MCF-7 compared to 115000 cells/well for Hs578T. This suggests that for comparing both cell lines, it is important to take into account an activity/number of cells and not an activity/OD MTT. Therefore, the single cell fluorescence was obtained after normalization with the cell number in each well. Applying this method of analysis, we have been able to express microplate reader calcein fluorescence in single cell fluorescence. Interestingly, it has been observed that the PSC833 is more effective than the VRP.

**2.2. Flow Cytometry Cell Population Fluorescence (FL1) versus Fluorescence Concentration (FL1-FC).** By using a Beckman Coulter cell lab quanta with electronic volume instead of forward scatter (Figure 2), we were able to take into account the cell volume in fluorescence analysis. This normalization is important as the cell volume is changing among the same population. Therefore, we determined both the specific cell fluorescence concentration (FL1-FC) and the classic fluorescence (FL1). The results are reported in Figure 2. Then we measured the effect of the two P-gp blockers. No significant differences between analyses on FL1 or FL1-FC have been found. For further experiments, we choose to read our sample in FL1-FC. Indeed, the specific cell fluorescence concentration can potentially be used with primary cultures that are known to be very heterogeneous. We confirmed by this method that the PSC833 is more effective than the VRP.

**2.3. Limit of Detection (LOD).** We wanted to determine the LOD of both methods used to monitor the P-gp efflux activity under treatment. The LOD of an analytical method is an important parameter when quantitative measurements have been done. In quantum chemistry, LOD is defined as the smallest concentration of a substance that could be detected but not quantified. The LOD of our methods correspond to the smallest efflux activity variation measurable between two P-gp inhibitors. Therefore, we choose a low concentration of inhibitors 100 nM of PSC833 or VRP. The intermethods comparison indicates that for the less powerful blocker, VRP, the LOD was enhanced using the microplate reader. However, for the most powerful, PSC833, the LOD is similar using both techniques. For the MPR, the intramethod comparisons compare the mean fluorescence versus the normalize fluorescence; and for the flow cytometry, to compare FL1 to FL1-FC. In both cases, LODs were not enhanced with the different data processing. A summary of our results is shown in Table 1.

**2.4. Linearity.** Linearity defines the analytical response as a function of analyte concentration over which acceptable linearity is achieved. Therefore, MCF-7 parental sensitive cells were incubated with different concentrations of calcein-AM (Figure 3). Linear regression has been used to fit each concentration (microplate reader  $r^2 = 0,9929$ ; flow cytometry  $r^2 = 0,9951$ ). Measured values were proportional to calcein concentration used. Hence, we can conclude that linearity

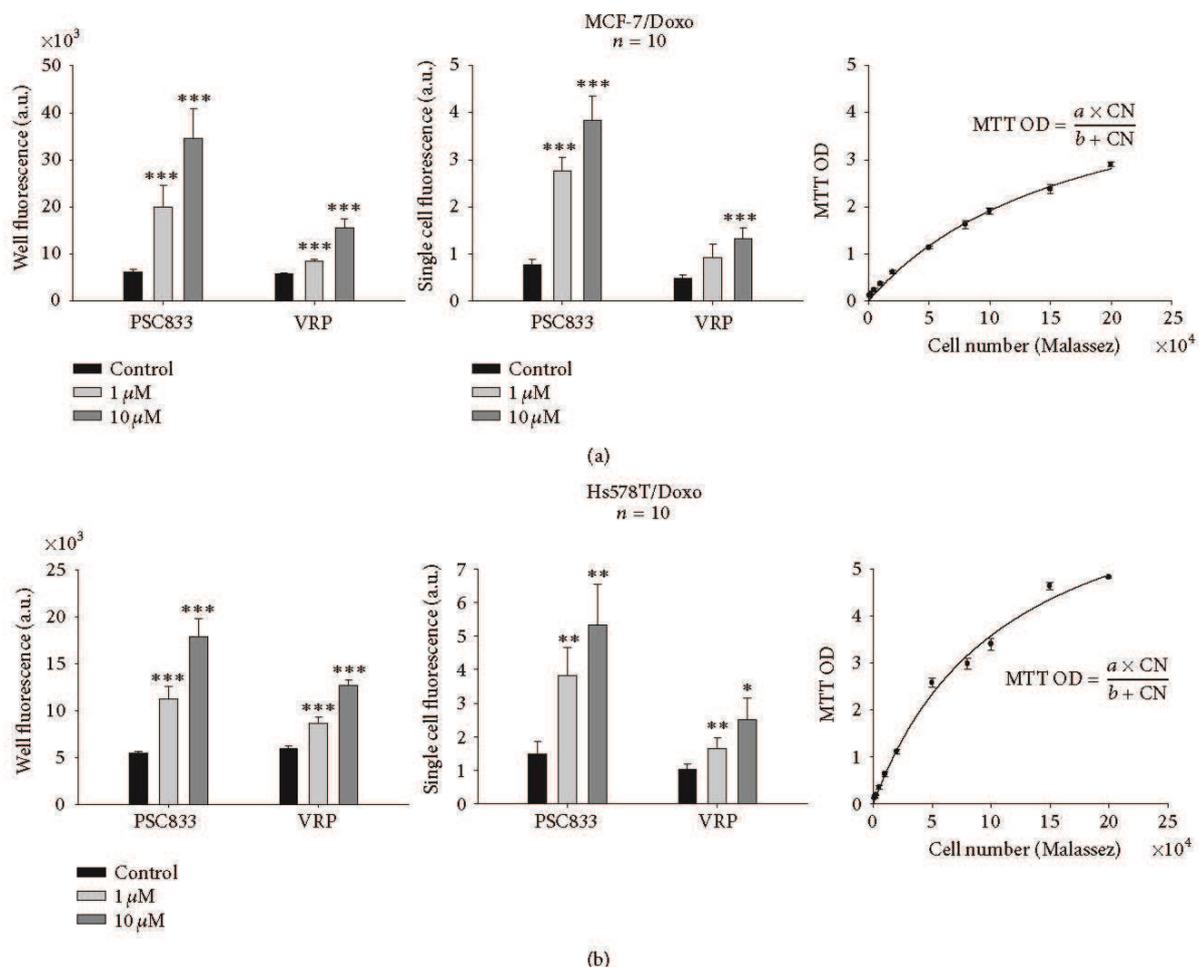


FIGURE 1: Effects of P-glycoprotein blockers on calcein-AM efflux obtained by quantifying whole well or cell-normalized well fluorescence with a microplate reader. P-gp activity was measured as the ability to efflux the fluorescent P-gp allocrite calcein-AM. MCF-7/Doxo (a) or Hs578T/Doxo (b) multidrug resistant P-gp overexpressing breast cancer cell lines were incubated with 0, 1, or 10  $\mu\text{M}$  of the P-gp antagonists verapamil (VRP) or PSC833. Left: global cell population P-gp activity was quantified by measuring whole well fluorescence (arbitrary units, A.U.) in 6-plicates for 10 repeated experiments in each condition. Middle: a normalized single cell P-gp activity (A.U.) was obtained from cell population in each well by computing the ratio of whole well fluorescence to the number of cells in the corresponding well. In this respect, an MTT assay was systematically performed after the fluorescence readings to determine the number of cells in each well of the microplate. Right: MTT calibration curves. MTT optical density (MTT OD) varied as a function of the number of cells (NC) deposited in the wells, in a saturation type Michaelis-Menten relationship. For calibration, the number of cells was determined by using a Malassez counting chamber. Curve fitting to the data gave the following parameters:  $a = 5, 27$ ;  $b = 175092$  for MCF-7/Doxo cells and  $a = 7, 64$ ;  $b = 113025$  for Hs578T/Doxo cells, respectively. Data are presented as mean  $\pm$  sem with  $n = 10$  independent assays per data point. Results significantly different from the control are indicated (\* $P < 0, 05$ ; \*\* $P < 0, 01$ ; \*\*\* $P < 0, 001$ ; paired Student's  $t$ -test).

is acceptable up to  $1\mu\text{M}$ . For monitoring P-gp efflux, we used a concentration of  $0.25\mu\text{M}$ ; the linearity was therefore adequate for both methods.

**2.5. Precision.** The precision (also called reproducibility or repeatability) is the degree to which repeated measurements are able to show the same results under unchanged conditions. Thus, precision quantifies the variability of an analytical result as a function of operator, method manipulations, and day-to-day environment. Statistical analysis of data generated are essential to demonstrate assay precision.

Repeatability, in flow cytometry, consists to analyse the peak distribution in only one experimentation. The coefficient of variation (CV) obtained from the 10 experiments with each blocker has been determined using the cell lab quanta software (Figure 4(a)). In the control conditions (concentration = 0), the CV values are scattered. This means that the efflux capacity of the P-gp is heterogeneous in resistant cell population. It has been observed that CV values decrease as VRP or PSC833 concentration increases. All the cells converge to a nonactivity response corresponding to the concentration maximal for the calcein in the cells. Moreover,

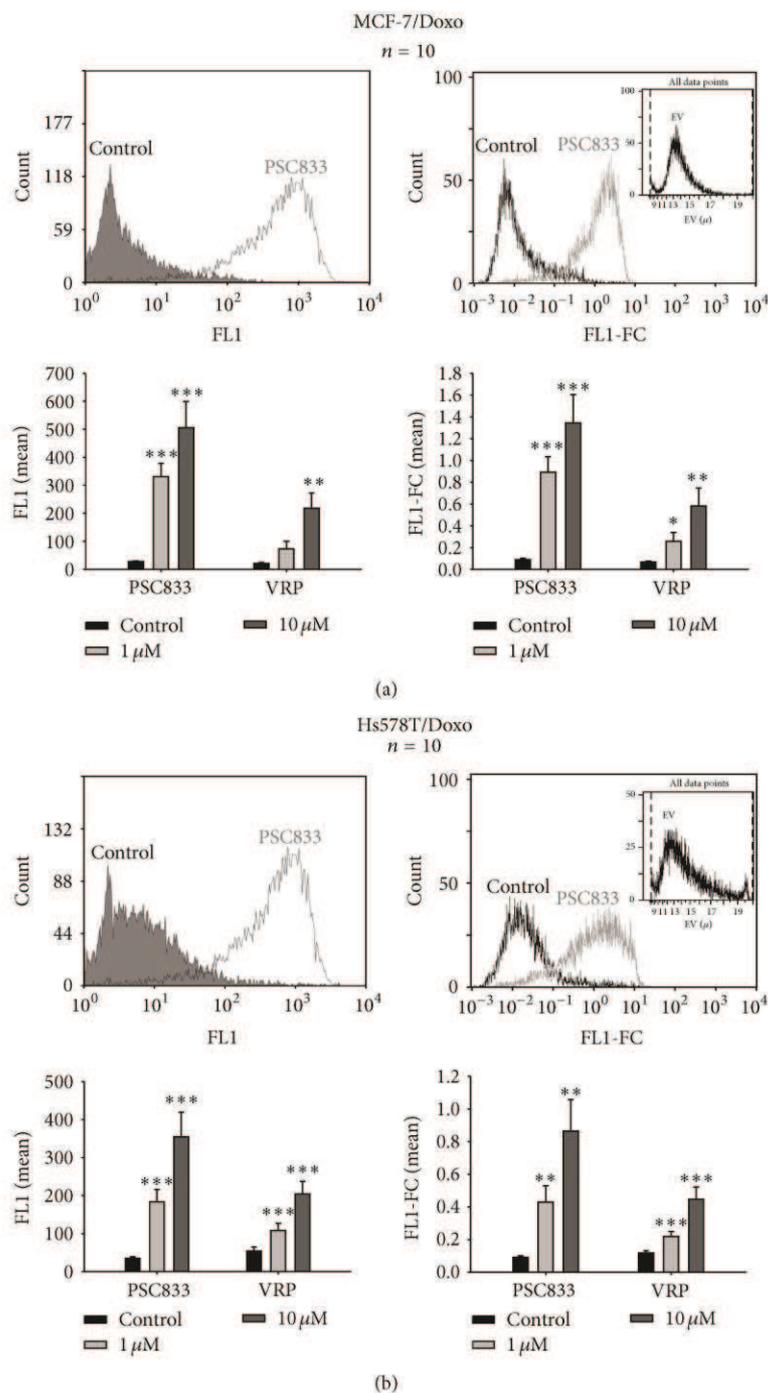


FIGURE 2: Effects of P-glycoprotein blockers on calcein-AM efflux obtained by analyzing single cell fluorescence (FL1) or fluorescence concentration (FL1-FC) with a flow cytometer. P-gp activity was followed with calcein-AM as a fluorescent probe. In each flow cytometry measurement, a sample of 10 000 cells was analyzed. (a) Top panels, left: superimposed all-events histograms of calcein fluorescence distribution (log scale) in control MCF-7/Doxo (solid gray histogram) and MCF-7/Doxo preincubated with the P-gp noncompetitive antagonist PSC-833 (10  $\mu$ M, open histogram). Right: the amount of fluorescence per cell is expressed as FL1-FC (fluorescent light in channel 1-fluorescence concentration) which is the fluorescent light (FL) divided by the electronic volume (EV) determined by the flow cytometer according to the Coulter Principle. The EV distribution of the sample is given in insert. Bottom panels: the two histograms present the mean fluorescence, FL1 (left) and the cell volume normalized fluorescence, FL1-FC (right) without or with 1  $\mu$ M or 10  $\mu$ M of PSC833 or verapamil (VRP) for 10 repeated experiments. (b) The same experiments were carried out in Hs578T/Doxo. Data are presented as mean  $\pm$  sem with  $n = 10$  independent assays per data point. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

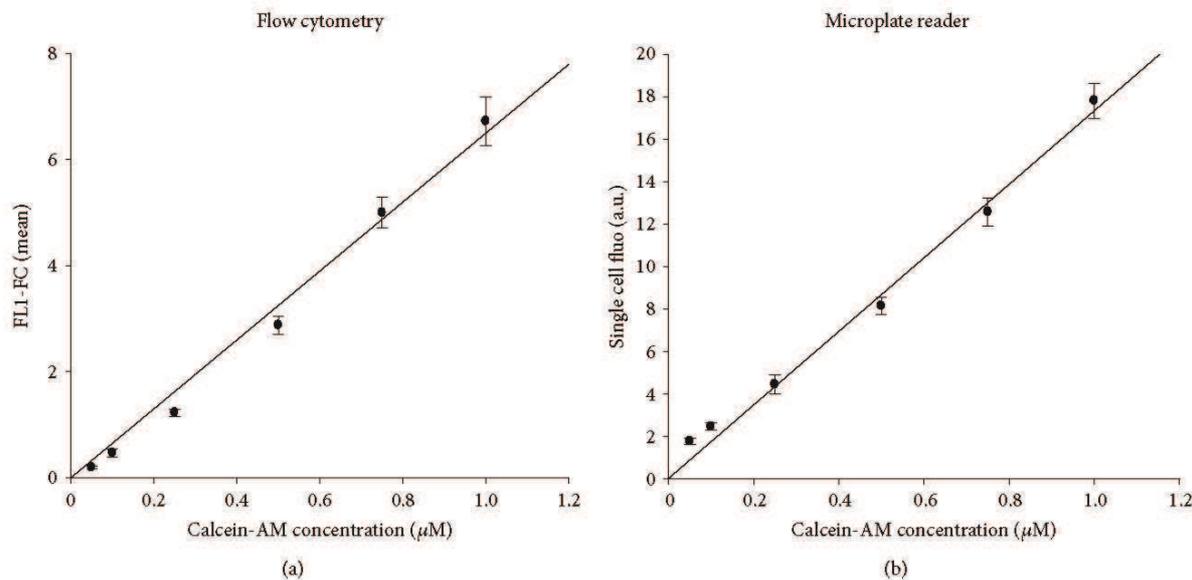


FIGURE 3: Microplate reader and flow cytometer fluorescence responses linearity. MCF-7 drug-sensitive parental cells were incubated during 15 minutes in the dark with 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75, or 1 µM of calcein-AM. Cells were analysed by flow cytometry for mean volume-normalized fluorescence (FLI-FC, (a)) and by a microplate reader for cell-normalized well fluorescence (b). Data are presented as mean ± sem with  $n = 10$  independent assays per data point.

TABLE 1: Intermethods comparison of fluorescence increase detection thresholds.

	MCF-7		Hs578T	
	0,1 µM VRP	0,1 µM PSC833	0,1 µM VRP	0,1 µM PSC833
<i>Flow cytometer</i>				
Mean FLI	**	***	*	***
Mean FLI-FC	**	***	*	**
<i>Microplate reader</i>				
Well fluorescence	***	*	**	**
Single cell fluorescence	***	***	**	**

Flow cytometer (mean FLI and mean FLI-FC) and microplate reader (whole well fluorescence and mean single cell fluorescence) signal increase detection thresholds were estimated by testing groups of untreated cells and cells treated with the lowest P-gp antagonists concentration (0,1 µM) for significant differences (\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; paired Student's  $t$ -test;  $n = 10$ ).

the CV values distribution becomes more clustered when the blocker concentration increases. In conclusion, there is a better repeatability with higher P-gp blocker concentrations.

Using the microplate reader, repeatability corresponds to the CV values of 6 replicates carried out for each experiment (Figure 4(b)). With the flow cytometry, we read directly CV values from the software but with the microplate reader, CV values were calculated using the following mathematical equation:  $CV = 100 \times \text{standard deviation}/\text{mean}$ , with 6 replicates of each of 10 experiments. There was no difference in the CV values between blockers concentration. Then, we

can conclude, the repeatability is independent of the blocker concentrations in the microplate reader.

Replicability is the variability of the measurements obtained by one person while measuring the same item repeatedly. To underline the compared repeatability between both methods, the mean fluorescence (FLI-FC) was formulated as function of single cell fluorescence for each PSC833 concentration for the 10 biological replicates (Figure 5). Thus, each point represents a separate experiment within same manipulation condition on MCF-7/Doxo. Each graph represents a PSC833 concentration. For high concentration of PSC833, sample values diverge away from the ratio of the means for the two methods. In conclusion, when blockers are used in high concentration, the single cell fluorescence is more variable.

**2.6. Difference between the Two Methods.** To compare both measuring techniques, we formulated the differences by using Altman and Bland method [21]. Fluorescence was expressed as a function of control ( $FL_{\text{block}}/FL_{\text{ctrl}} = \Delta F$ ). Mean of flow cytometry fluorescence or MPR fluorescence were shown on the  $x$  axis and the difference on the  $y$  axis (Figure 6). When the blockers concentration was increased, the difference between the two methods was higher. This result means that the difference between the highest fluorescence and the lowest fluorescence is more important in flow cytometry than in the MPR.

**2.7. Doses Responses Curves.** Doses responses curves represented in Figure 7 allowed us to determine the  $EC_{50}$  (half maximal effective concentration) of each blocker for each

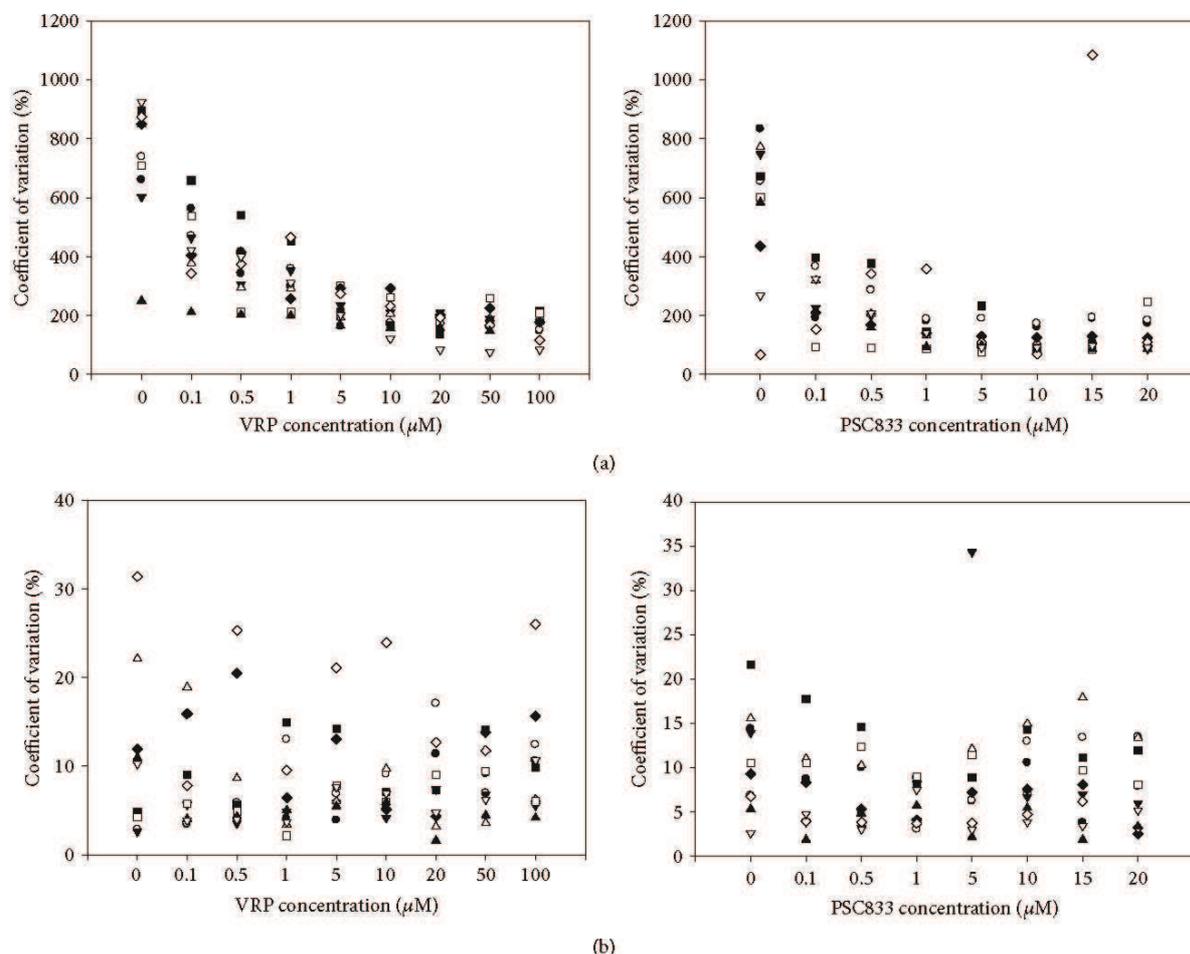


FIGURE 4: Intramethod technical replicability within ten independent biological samples. (a) Graphs show coefficient of variation (CV) of ten independent samples analyzed by flow cytometry after treatment with various concentrations of VRP (left) or PSC833 (right). A sample consists in the analysis of 10 000 cells. CV is expressed as the ratio of the standard deviation (SD) of the peak to the mean channel value (in percent) and provides a measure of the variability in signal intensity. (b) Coefficient of variation ( $CV = 100 \times SD/mean$ ) of 6-plicated measurements of fluorescence obtained with a microplate reader for ten independent biological samples exposed to different concentrations of VRP.

method. The experimental point was fitted with doses-responses curves by Sigma Plot 11 Software.  $EC_{50}$  and  $E_{max}$  (maximal effect) were reported in Table 2. Although, the potency of PSC833 in all cell lines tested was similar with the two methods, results with VRP were highly fluctuating. Based on the differences seen when the blocker concentration increases, we conclude that efficacy level obtained with flow cytometry was higher than that of the microplate reader method.

Therefore, analysing the mean fluorescence of the population resulted in a loss of information using the technique flow cytometry. Indeed, for the low level of fluorescence, the signal varies from 1 to 10, whereas for the higher one, the signal oscillated between 10 and 5000 (Figure 2). This indicates that at the time of measurement, the inhibitors did not have the same efficacy on the different cell subpopulations. Therefore, when using the inhibitors, the fluorescence mean values were different from the most often detected fluorescence (fluorescence at the peak or mode). Thus, we represented

TABLE 2:  $EC_{50}$  and  $E_{max}$  values obtained from the doses responses curves.

	$EC_{50}$ ( $\mu M$ )		$E_{max}$	
	FC	MPR	FC	MPR
MCF-7/Doxo PSC833	1,40	1,23	16,03	6,01
MCF-7/Doxo VRP	28,29	68,04	24,59	10,39
Hs578T/Doxo PSC833	1,83	1,40	11,99	4,48
Hs578T/Doxo VRP	102,00	24,96	44,70	6,27

Values are given for the two methods (flow cytometry—FC and microplate reader—MPR) with the two different antagonists for the two cells lines, MCF-7/Doxo and Hs578T.

the doses responses curves with the fluorescence at the peak for the PSC833 in flow cytometry (Figure 8). This data

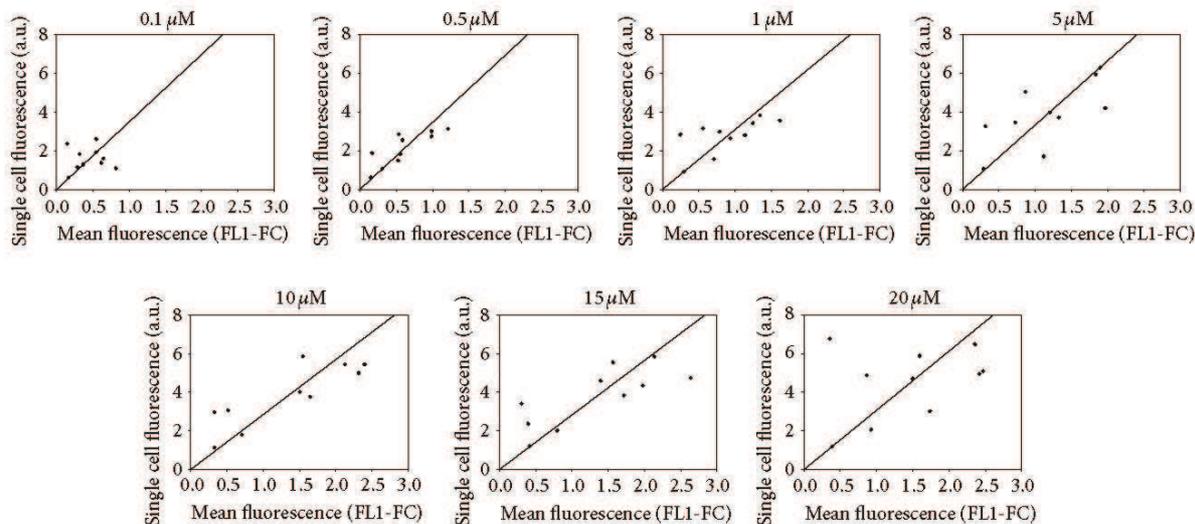


FIGURE 5: Intermethods comparison of repeatability for increasing PSC833 concentration. Each graph shows the distribution of calcein fluorescence in 10 samples analyzed with both methods. Cell-normalized well fluorescence in microplate reader is expressed as a function of cell fluorescence concentration (FL1-FC) in flow cytometry for increasing concentrations of PSC833. Straight line corresponds to the mean methods fluorescence ratio.

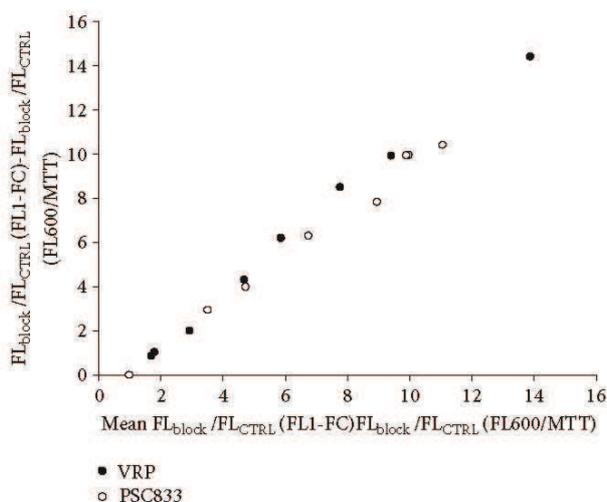


FIGURE 6: Method responses differential as a function of mean fluorescence. The graph shows the differences between fluorescence measured in flow cytometry (FL1-FC) and microplate reader (cell-normalized well fluorescence) as function of mean fluorescence measured in these two methods. Gap between flow cytometry and microplate reader responses linearly increased with P-gp blockers-induced fluorescence accumulation.

representation is impossible for the VRP because this inhibitor was not effective enough.  $EC_{50}$  calculated with this representation seem to fit with the data obtained for the mean of fluorescence, while the  $E_{max}$  values were completely different.

### 3. Discussion and Conclusion

In this paper, we compared simple, sensitive, and specific methods with fluorescence detection for the P-gp efflux activity in MCF-7 and H5578T, as well as in resistant variants

of these cell lines, MCF-7/Doxo and H5578T/Doxo. Regardless of the technical issues, both described methods, flow cytometry and microplate reader can be used to measure the *in vitro* effectiveness of P-gp inhibitors at low concentrations. First, we studied the effects of P-glycoprotein blockers on calcein-AM efflux by quantifying the empire fluorescence of the whole well or cell-normalized well fluorescence with a microplate reader. There were no important differences between the two different ways of analysis, however, we should emphasize that we used two MDR cell lines that are really homogenous. The same experiments should be

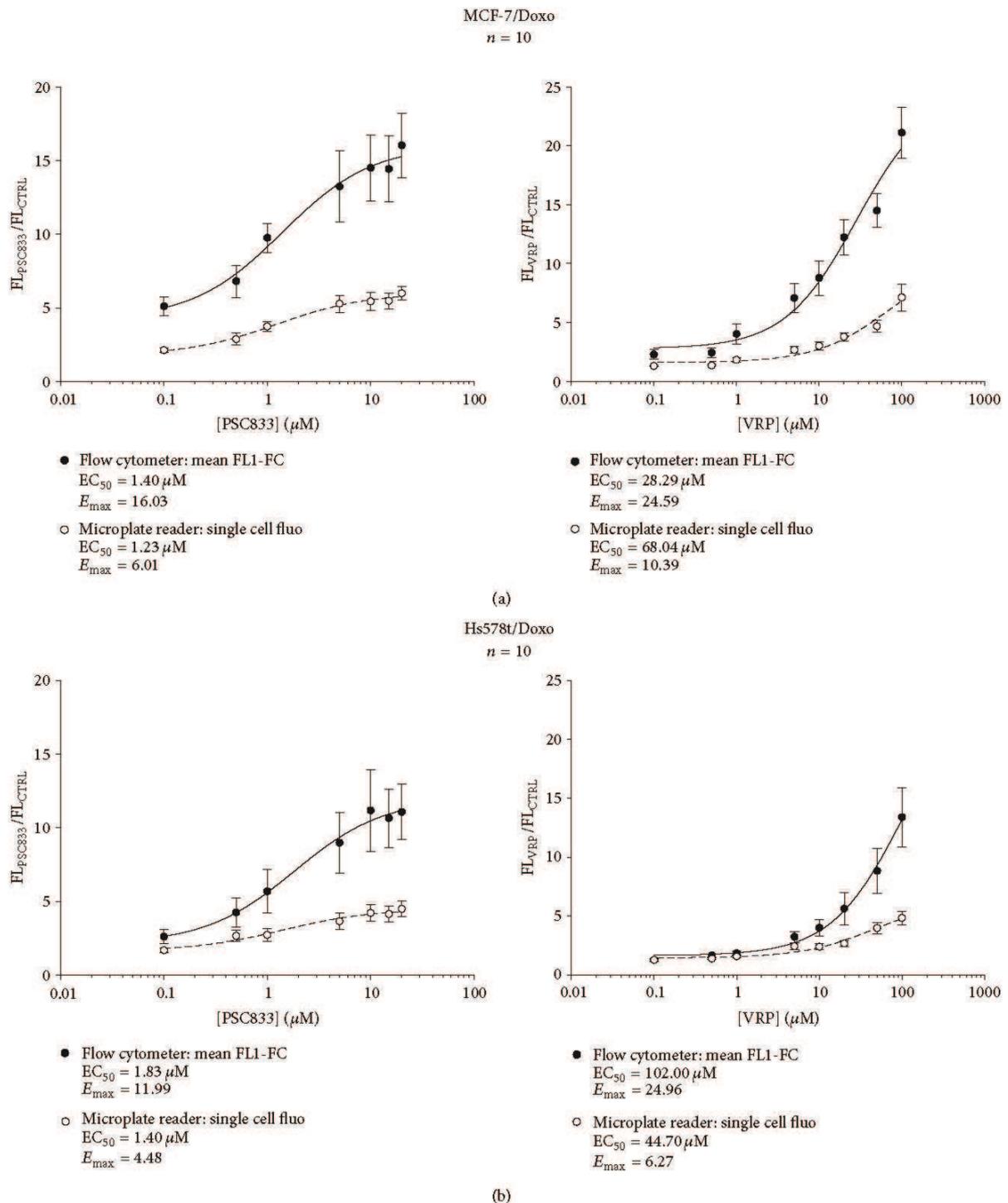


FIGURE 7: Intermethods comparison of PSC833 and verapamil doses responses curves expressed as mean fluorescence. Superimposed microplate reader and flow cytometry semilogarithmic doses responses curves showing the effect of increasing verapamil or PSC833 concentrations on calcein accumulation in MCF-7/Doxo (a) or Hs578T (b). Each point represents means  $\pm$  sem (10 independent experiments) of cell-normalized well fluorescence (open circles) or flow cytometry mean FL1-FC (filled circles) expressed as the ratio of signals in the presence of blocker to signals in control conditions. Ligand binding sigmoidal doses responses curves were fitted to the data to obtain blockers potencies (half-maximal effective concentration,  $EC_{50}$ ) and efficacies (maximum response,  $E_{\text{max}}$ ).

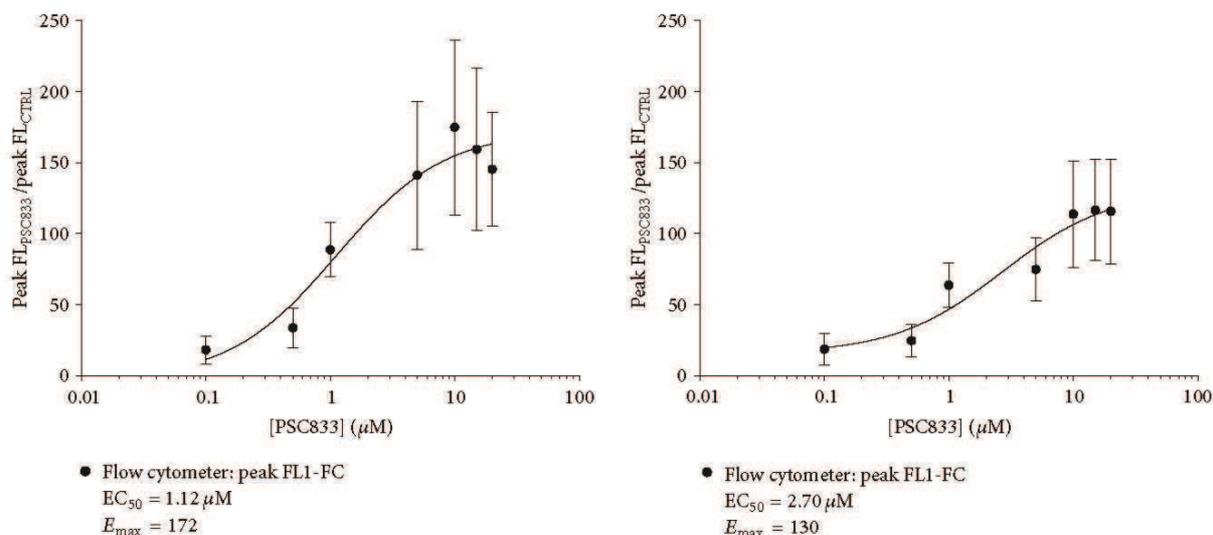


FIGURE 8: Flow cytometry PSC833 doses responses curves obtained by analyzing modal single cell fluorescence concentration (FLI-FC). Semilogarithmic doses responses curves showing the effect of increasing PSC833 concentrations on calcein accumulation in MCF-7/Doxo. Each point represents peak (modal)  $\pm$  sem (10 independent experiments) of FLI-FC in MCF7/Doxo (a) or Hs578T/Doxo (b) expressed as the ratio of signal in the presence of PSC833 to signal in control conditions. Ligand binding sigmoidal doses responses curves were fitted to the data to obtain PSC833 potency (half-maximal effective concentration,  $EC_{50}$ ) and efficacy (maximum response,  $E_{max}$ ).

performed using coculture or primary cells. This conclusion is the same for the analysis with FL1 and FL1-FC in flow cytometry. When we compare the results obtained with flow cytometry or MPR, we can see that the differences between basal fluorescence and fluorescence in presence of blockers are nearly the same between the two methods. Both methods have the same range of scale to detect P-gp activities. And this is confirmed by the LOD analysis.

The intramethod comparisons showed that when we analysed the fluorescence by flow cytometry the CV value is inversely correlated with the fluorescence level, which correlates to the efflux activity. Therefore, the flow cytometry is more accurate for higher level of inhibition. When we analysed the fluorescence by MPR, the CV values seem to be independent of the efflux activity. We could therefore discern a "V" pattern using the MPR CV values, with the smaller CV values reflecting intermediate efflux activity.

The two methods indicate with precision the blocker answers disparity. Thereby, when we express the single cell fluorescence in MPR as a function of the mean FLI-FC, we can notice that when the fluorescence increases, the values are dispersing around the diagonal but remain around the medium ratio values.

When we compared the two techniques by using the Altman and Bland method, we noticed that when the fluorescence increases the difference between the two methods was amplified. The fluorescence variance increases linearly with the fluorescence level which suggests that the efficacy of the MPR decreases with the increasing of P-gp inhibition. Thus, we were not able to determine an accurate value for  $E_{max}$  with the MPR method. There is also a consequence on the  $EC_{50}$  determination. For the more effective inhibitor

(PSC833),  $EC_{50}$  is the same with the two methods. However, for the less effective inhibitor (VRP), the curve never reaches effective inhibition and as a result of that, the accurate  $E_{max}$  cannot be determined by the MPR technique. Using flow cytometry, PSC833 doses responses curves obtained by analysing modal single cell fluorescence concentration (FLI-FC) confirmed the  $EC_{50}$  values obtained with the classical dose response curve. Therefore, the  $E_{max}$  values are higher because no detection of the fluorescence dilution was detected from the cells which are less affected by the inhibitor.

In conclusion, the MPR is more powerful for the detection of small inhibition but the flow cytometry method is more reliable at higher concentrations of inhibitors. This observation is the same for both inhibitors tested. Therefore, it is independent of the sort of the blocker. To determine precisely the inhibition efficacy it is important to use the flow cytometer. To give correct value for  $E_{max}$  and  $EC_{50}$ , we cannot rely on the MPR method.

Therefore, microplate reader could be used to screen P-gp blockers and flow cytometry for accurate analysis. In summary, the presented methods are simple and can be routinely used in determination of potential P-gp inhibition of various compounds. Depending on the user's specific needs, both methods can be applicable and potentially used to detect effects of competitive and noncompetitive P-gp blockers.

## 4. Methods

**4.1. Cell Lines.** The study was carried out with human breast carcinoma derived cells, MCF-7 and Hs578T and multidrug resistant variant of these cells lines (MCF-7/DOXO and

Hs578T/DOXO), kindly obtained from Pr. J. P. Marie (Hôtel Dieu, Paris, France). MCF7/DOXO and Hs578T/DOXO cells were, respectively, isolated by stepwise selection with increasing concentrations of doxorubicin [22]. Cells were maintained in RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO) containing 5% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma, St. Louis, MO), 2 mM L-glutamine (Sigma, St. Louis, MO), and 1% antibiotic/antimycotic solution (Sigma, St. Louis, MO) and incubated in a humidified atmosphere containing 5% of CO<sub>2</sub> at 37°C.

**4.2. Reagents.** Purified doxorubicin (DOXO), verapamil (VRP), DMSO, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide), and phosphate buffer saline (PBS buffer, pH 7.4) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Calcein acetoxy-methylester (calcéine-AM) was supplied by Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA). SDZ PSC833 (PSC833) was kindly provided by Pr. J. P. Marie (Hôtel Dieu, Paris, France). Final concentration of DMSO and H<sub>2</sub>O was less than 0.1%.

**4.3. Samples Preparation.** For the calcein-AM efflux assay, cells were cultured at 80 or 90% confluency in T25. Cells were detached by trypsin/EDTA treatment. The experiments were initiated by washing the cells with PBS. Cells were treated with 0, 1, or 10 μM of antagonists VRP or PSC833 at 37°C for 30 min. Then 0,25 μM of calcein-AM were added to each well. After 15 min incubation at 37°C, cells were washed twice with PBS and splitted to quantify P-gp activity by fluorescence in a microplate reader or in a flow cytometer. Ten experiments were independently performed for each condition.

**4.4. Measurement of P-gp Activity.** For the evaluation activity by flow cytometry, fluorescent light (FL) was quantified using a cell lab quanta SC MPL flow cytometer (Beckman Coulter) equipped with a 22 mW 488 nm excitation laser. The voltage settings of photomultipliers remained unchanged throughout the experiments. For each analysis we recorded 10,000 events, triggered on electronic volume (EV) as primary parameter, according to a particle diameter exceeding 8 μm. Green FL of calcein was quantified via the FL1 channel (log scale) through a 525 nm band pass filter.

For the evaluation of P-gp activity by microplate reader, calcein fluorescence was quantified using a FL-600 microplate fluorometer (Bio-tek instruments, Winooski, VE). For each experiment, six wells were measured in parallel ( $k_{ex} = 494$  nm and  $k_{em} = 517$  nm).

**4.5. Cell Viability Study (MTT Assay).** In order to take the number and viability of cells into account, an MTT assay was systematically performed after reading the calcein fluorescence. 10% of MTT reagent was added to each well to a final concentration of 500 μg/mL, and the cells were incubated for 4 hours at 37°C. The medium has been then replaced with 200 μL of DMSO to dissolve the reaction product. The optical density was read at 570 nm versus 630 with an Elx 808 microplate reader (Bio-tek Instruments, Winooski, VE).

Normalized calcein accumulation was then expressed as the ratio of the well fluorescence to the MTT absorbance.

**4.6. Statistics.** For statistical analysis and graphical representation, Excel (Microsoft Corporation) and SigmaPlot (SysStat, Erkrath, Germany) softwares were used. Numerical results are given as means ± SEM ( $n =$  sample size). The statistical significance was assessed with SigmaPlot or Excel software according to either a Student's *t*-test. Statistical significance was accepted for \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

## Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

## Authors' Contribution

Conception and design are made by Jennifer Pasquier and Frank Le Foll. Acquisition of data is made by Jennifer Pasquier, Damien Rioult, Sabine Marie, and Nadine Abu-Kaoud. Analysis and interpretation of the data are made by Jennifer Pasquier, Damien Rioult, and Frank Le Foll. Paper preparation is done by Jennifer Pasquier, Bella S. Guerrouahen, and Frank Le Foll wrote the paper. Paper reviewing is done by Jennifer Pasquier, Bella S. Guerrouahen, Nadine Abu-Kaoud, and Frank Le Foll. All authors read and approved the final paper.

## Acknowledgments

This work was supported by European Regional Development Fund as part of the Interreg IVA Project Admin (Transchanel Advanced Microscopy network). Jennifer Pasquier and Damien Rioult were recipients for a fellowship from the Conseil Regional de Haute-Normandie. The authors are indebted to Pr. Jean-Pierre Marie (Hôtel Dieu, Paris, France) for providing MCF-7/Doxo and PSC833. This paper was made possible by Grants from the Qatar National Research Fund under its National Priorities Research Program Award nos. NPRP 09-1099-3-279, NPRP 09-1174-3-291, and NPRP 4-640-1-096. Its contents are solely the responsibility of the authors and do not necessarily represent the views of the Qatar National Research Fund.

## References

- [1] A. Pluen, Y. Boucher, S. Ramanujan et al., "Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial versus subcutaneous tumors," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 8, pp. 4628–4633, 2001.
- [2] B. J. Druker, C. L. Sawyers, H. Kantarjian et al., "Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome," *The New England Journal of Medicine*, vol. 344, no. 14, pp. 1038–1042, 2001.

- [3] J. L. Biedler and H. Riehm, "Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells *in vitro*: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies," *Cancer Research*, vol. 30, no. 4, pp. 1174–1184, 1970.
- [4] J. A. Endicott and V. Ling, "The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 58, pp. 137–171, 1989.
- [5] I. Boschi and J. Croop, "P-glycoprotein multidrug resistance and cancer," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1288, no. 2, pp. F37–F54, 1996.
- [6] S. V. Ambudkar, S. Dey, C. A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan, and M. M. Gottesman, "Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 39, pp. 361–398, 1999.
- [7] S. V. Ambudkar, C. Kimchi-Sarfaty, Z. E. Sauna, and M. M. Gottesman, "P-glycoprotein: from genomics to mechanism," *Oncogene*, vol. 22, no. 47, pp. 7468–7485, 2003.
- [8] A. H. Schinkel, "The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 8, no. 3, pp. 161–170, 1997.
- [9] I. B. Holland and M. A. Blight, "ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans," *Journal of Molecular Biology*, vol. 293, no. 2, pp. 381–399, 1999.
- [10] D. Turk and G. Szakacs, "Relevance of multidrug resistance in the age of targeted therapy," *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, vol. 12, pp. 246–252, 2009.
- [11] B. J. Trock, F. Leonessa, and R. Clarke, "Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 89, no. 13, pp. 917–931, 1997.
- [12] I. F. Faneyte, P. M. Kristel, and M. J. van de Vijver, "Determining MDR1/P-glycoprotein expression in breast cancer," *The International Journal of Cancer*, vol. 93, pp. 114–122, 2001.
- [13] W. T. Beck, T. M. Grogan, C. L. Willman et al., "Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations," *Cancer Research*, vol. 56, no. 13, pp. 3010–3020, 1996.
- [14] H. J. Broxterman, P. Sonneveld, N. Feller et al., "Quality control of multidrug resistance assays in adult acute leukemia: correlation between assays for P-glycoprotein expression and activity," *Blood*, vol. 87, no. 11, pp. 4809–4816, 1996.
- [15] J. Meesungnoen, J.-P. Jay-Gerin, and S. Mankhetkorn, "Relation between MDR1 mRNA levels, resistance factor, and the efficiency of P-glycoprotein-mediated efflux of pirarubicin in multidrug-resistant K562 sublines," *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 80, no. 11, pp. 1054–1063, 2002.
- [16] J. Pasquier, L. Galas, C. Boulangé-Lecomte et al., "Different modalities of intercellular membrane exchanges mediate cell-to-cell P-glycoprotein transfers in MCF-7 breast cancer cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 10, pp. 7374–7387, 2012.
- [17] O. Legrand, G. Simonin, J. Y. Perrot, R. Zittoun, and J. P. Marie, "Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients," *Blood*, vol. 91, no. 12, pp. 4480–4488, 1998.
- [18] L. Homolya, Z. Hollo, U. A. Germann, I. Pastan, M. M. Gottesman, and B. Sarkadi, "Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 29, pp. 21493–21496, 1993.
- [19] M. Marin, H. Legros, A. Poret, F. Le Boulenger, and F. Le Foll, "Cell responses to xenobiotics: comparison of MCF7 multi-drug- and mussel blood cell multi-xenobiotic-defense mechanisms," *Marine Environmental Research*, vol. 58, no. 2–5, pp. 209–213, 2004.
- [20] J. Pasquier, P. Magal, C. Boulangé-Lecomte, G. Webb, and F. Le Foll, "Consequences of cell-to-cell P-glycoprotein transfer on acquired multidrug resistance in breast cancer: a cell population dynamics model," *Biology Direct*, vol. 6, article 5, 2011.
- [21] D. G. Altman and J. M. Bland, "Comparison of methods of measuring blood pressure," *Journal of Epidemiology and Community Health*, vol. 40, no. 3, pp. 274–277, 1986.
- [22] C. Maulard, J.-P. Marie, S. Delanian, and M. Housset, "Clinical effects on CA 15-3 level of cyclosporin A as a chemosensitizer in chemoresistant metastatic breast cancer," *European Journal of Cancer A*, vol. 29, no. 3, p. 480, 1993.