

DEA ICTM
(INTERACTIONS CELLULAIRES ET TRANSPORTS MEMBRANAIRES)
Année 2002/2003

64192
E700.ATO.E
041980.

RAPPORT DE STAGE

Présenté par : Emilie ATON

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

Sujet de recherche:

**Etude des mouvements calciques dans les hémocytes
de l'huître creuse *Crassostrea gigas* : 1^{ères} approches
expérimentales**

Stage effectué au Laboratoire des Biomembranes et de Signalisation Cellulaire (LBSC)
UMR/CNRS
U.F.R Sciences fondamentales et appliquées
40, avenue du Recteur Pineau
86022 POITIERS.

et au Laboratoire de Génétique et de Pathologie (LGP)
IFREMER
17390 La Tremblade.

Sous la direction de :

Nathalie Imbert : Maître de Conférence à l'Université de La Rochelle.

Christian Cognard : Directeur de Recherche CNRS à Poitiers.

Tristan Renault : Chercheur à l'IFREMER de La Tremblade.

SOMMAIRE:

Introduction	1
Rappels Bibliographiques	2
A/ Les huîtres: mollusques bivalves	
B/ Les hémocytes: acteurs de l'immunité chez les bivalves	
C/ Rôle du calcium et mécanismes de signalisation impliqués dans la motilité, la migration par chimiotactisme et la phagocytose des hémocytes	
D/ Transferts calciques des hémocytes et implication dans la réponse immunitaire	
E/ Effets de certains polluants sur le système immunitaire des huîtres	
Matériel et Méthode	8
A/ Matériel Biologique	
B/ Techniques d'analyse	
Résultats	18
A/ Analyse en cytométrie de flux	
B/ Analyse sur cellules isolées par cytofluorimétrie et microscopie confocale	
Discussion	28
A/ Analyses préliminaires: effet du SP, du DMSO et des sondes calciques sur la viabilité, certaines activités enzymatiques et les activités de phagocytose des billes	
B/ Concentration calcique cytoplasmique	
C/ Canaux calciques	
Conclusion/Perspectives	30
Bibliographie	31

LBEM

Je remercie le Docteur Nathalie Imbert, Maître de Conférences à l'Université de La Rochelle, d'avoir initié ce projet et de m'avoir permis de réaliser mon stage de maîtrise et de DEA sur ce thème. Je la remercie de son soutien et de ses conseils.

LBSC

Je remercie le Docteur Guy RAYMOND de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire des Biomembranes et Signalisations Cellulaires (CNRS UMR 6558).

Je remercie le Docteur Christian Cognard pour son aide, ses conseils, sa disponibilité et son soutien.

Je remercie le Docteurs Stéphane Sébille et le Docteur Bruno Constantin pour nos discussions scientifiques et nos discussions tout court.

Je remercie chaleureusement Haouaria Balghi, Aurélie Vandebrouck et Renaud Robert pour leur très sympathique présence. Je remercie Haouaria et Aurélie pour leur aide en photométrie et en microscopie confocale.

Merci à Françoise pour sa bonne humeur et sa gentillesse.

LGP (Ifremer La Tremblade)

Je remercie Philippe Gouletquer, directeur du Laboratoire de Génétique et Pathologie, de m'avoir acceptée dans le laboratoire.

Je remercie le Docteur Tristan Renault pour ses conseils et son aide.

Merci à Béatrice Gagnaire pour son aide lors de mes manips en cytométrie de flux et pour sa disponibilité.

Merci à Patrick Soletchnik pour m'avoir aidée à faire les analyses statistiques et pour m'avoir fait réfléchir sur l'importance des analyses multifactorielles quand on travaille sur un modèle animal vivant en milieu ouvert et soumis à de nombreuses variations environnementales.

Merci à Valérie Barbossa, Mathieu, Eric pour nos chouettes discussions du soir à la maison des stagiaires.

Merci à Bruno et Maeva de m'avoir fait une petite place dans leur bureau et pour leur bonne humeur tout au long de ces trois mois.

"En essayant continuellement, on finit par réussir. Donc plus ça rate, plus on a de chance que ça marche." Devise Shadok

INTRODUCTION

La France est le premier pays européens producteur de coquillages. Parmi les espèces cultivées, l'huître creuse *Crassostrea gigas* possède une place particulière. Cette espèce représente en effet environ 70 % des coquillages produits, soit une production annuelle de 150 000 tonnes. La conchyliculture représente donc en France un secteur d'activité qui bénéficie du soutien de l'Etat et des collectivités territoriales. Cependant, cette activité d'intérêt peut être mis en danger par divers aléas comme la dégradation du milieu d'élevage et/ou l'apparition et le développement de maladies infectieuses. Il est donc important de savoir comment les huîtres réagissent face à des situations de stress et vis à vis des agressions et à quel point leurs grandes fonctions physiologiques peuvent s'en trouver modifiées.

De nombreuses études en cours s'attachent aujourd'hui à évaluer l'impact de polluants divers tels que les métaux lourds (cadmium, plomb, mercure), les xénobiotiques et les phytosanitaires sur le système immunitaire des huîtres (*Oubella et al, 1994; Gagnaire et al, 2003*) et à comprendre les mécanismes mis en jeu (*Roch, 1999*). En effet, il est possible de suspecter qu'un milieu contaminé par divers polluants puisse avoir un effet immunosuppresseur chez les coquillages et de ce fait soit capable de favoriser l'émergence et le développement de maladies infectieuses.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux hémocytes de l'huître creuse *Crassostrea gigas* - les cellules impliquées dans les mécanismes de défense chez les bivalves - et plus particulièrement aux flux calciques qui peuvent exister dans ce type cellulaire. Le calcium est un second messager connu pour être impliqué dans de multiples fonctions comme la fécondation, l'adhésion, la migration cellulaire. Il assure en outre dans la cellule, la transduction de nombreux signaux de stimulation membranaires. Cet ion ubiquitaire est donc essentiel au bon fonctionnement de la machinerie interne de toute cellule, qu'elle soit issue d'un invertébré ou d'un vertébré, et on peut suspecter qu'il intervienne dans les mécanismes de défense.

Le but de ce travail était dans un premier temps de vérifier que les protocoles d'étude des flux calciques habituellement utilisés pour des cellules de mammifères étaient adaptables aux hémocytes d'huîtres. Dans ce contexte, des analyses de contrôle en cytométrie de flux ont été réalisées afin de tester l'innocuité des produits utilisés, dans les expériences sur le calcium, sur la viabilité et certaines fonctions des hémocytes. Dans un second temps, une fois les techniques validées, il s'agissait de mettre en évidence des mouvements de calcium au sein de ces cellules en essayant de déterminer la présence de certaines voies de transit calcique par l'utilisation d'agents pharmacologiques (BAPTA, ryanodine, caféine et 200K) connus pour leurs effets sur les mouvements calciques de cellules de mammifères. Cette approche a été réalisée sur des

populations d'hémocytes par la technique de cytométrie de flux et sur hémocytes isolés grâce aux techniques de cytofluorimétrie et de microscopie confocale. Par ailleurs nous avons tenté d'évaluer la quantité de calcium cytoplasmique - sous forme d'ions (calcium libre) - présent chez les hémocytes « au repos » (sans aucune stimulation expérimentale) grâce à des calibrations du couple dispositif expérimental/cellule et à l'équation de Grynkiewicz (*Grynkiewicz et al., 1985*). Comme précisé précédemment, à plus long terme, il s'agira de déterminer comment des variations de paramètres environnementaux (température, salinité, polluants) peuvent modifier ces flux calciques, et au final, les processus de défense.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

A/ Les huîtres : mollusques bivalves

Les invertébrés constituent environ 94 % des espèces animales connues. Les mollusques sont après les arthropodes le phylum qui contient le plus grand nombre d'espèces (50 000 espèces vivantes décrites). L'huître fait partie du groupe des lamellibranches (organismes sans tête possédant une coquille constituée de deux valves séparées et articulées au niveau d'une charnière). Elle dispose d'un système circulatoire dit semi-ouvert c'est à dire que l'hémolymphe (l'équivalent du sang chez les vertébrés) circule dans des vaisseaux et se déverse dans des sinus. L'hémolymphe baigne alors directement les organes. Le cœur est constitué d'un ventricule et de deux oreillettes. Il se trouve dans la cavité péricardique près du muscle adducteur (responsable de la fermeture et de l'ouverture de la coquille) et sa contraction permet la circulation de l'hémolymphe.

B/ Les hémocytes: acteurs de l'immunité chez les bivalves.

Les invertébrés ne possèdent pas de cellules capables de reconnaître spécifiquement les antigènes (comme les lymphocytes B ou T) . Ainsi, ils ne peuvent pas garder le souvenir de la rencontre avec un antigène et sont incapables de produire des immunoglobulines. Ils ne développent donc pas de mémoire immunitaire adaptative (Holmblad et Söderhäll, 1999), et ne se défendent vis à vis des pathogènes que par des réponses rapides, mettant en jeu les processus de phagocytose et de réactions inflammatoires regroupés sous le terme générique d' « immunité non spécifique » ou innée. Cette dernière s'articule autour d'une réponse humorale et d'une réponse cellulaire assurée par les hémocytes circulant au sein de l'hémolymphe.

On distingue grossièrement deux populations d'hémocytes, les granuleux ou granulocytes et les non granuleux nommés hyalinocytes. Au sein de ces deux catégories existent des sous types cellulaires en nombre variable suivant l'espèce d'invertébré considérée. (Auffret, 1989 ; Chagot, 1989).

1/Immunité à médiation cellulaire

Après une infection par des pathogènes, des substances toxiques ou une blessure plusieurs phénomènes inflammatoires se mettent en place : (i) constriction des vaisseaux et des sinus sanguins, (ii) élévation de la densité hémoducytaire (leucocytose) et (iii) infiltration dans les tissus affectés. La phagocytose est un des mécanisme prépondérant de la réponse immunitaire des bivalves marins. Les cellules reconnaissent les particules à phagocyter grâce à des récepteurs spécifiques (type lectine s'attachant spécifiquement à des sucres). De plus certains composants des parois de corps étrangers tels que les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycanes (PGN) et les β -1,3-glucans, induiraient le chimiotactisme et donc le rapprochement de la cellule phagocytaire du corps étranger . Le mécanisme est favorisé par des opsonines, présentes dans l'hémolymphe, capables de lier le pathogène et de se fixer ensuite sur des récepteurs spécifiques des hémoducytes. La membrane plasmique de la cellule immunitaire s'invagine alors pour englober les particules étrangères au sein d'une vacuole d'endocytose. Les lysosomes cellulaires migrent et fusionnent avec la vacuole formant un phagolysosome où les enzymes hydrolytiques relarguées dégradent l'agent infectieux. Ce mécanisme de destruction est associé à un métabolisme oxydatif intense («flambée oxydative ») conduisant à la formation de radicaux oxygénés toxiques. Il semble que chez les bivalves, granulocytes et hyalinocytes sont capables de phagocyter. Enfin, certains hémoducytes d'invertébrés possèdent une pro-enzyme nommée prophénoloxydase localisée dans des granules (Soderhäll et al., 1998). Elle est relarguée dans le sérum selon un processus actif de dégranulation induit par des agents infectieux et certaines molécules. Une fois déversée dans le sérum, elle est convertie par protéolyse (action d'une sérine protéase) en une forme active, la phénoloxydase (PO). Cette dernière est impliquée dans une cascade de réactions enzymatiques qui a été mise en évidence chez les crustacés et les tuniciers principalement (Niina Tujula et al., 2001). Elle permet la dégradation de corps étrangers et l'obtention au final de produit sous forme de pigments et notamment de mélanine. Des composants de la cascade peuvent aussi être impliqués dans l'opsonisation des pathogènes pour la phagocytose et être cytotoxiques.

2/Immunité à médiation humorale

L'immunité humorale est encore peu connue chez les mollusques bivalves mais il semble que ce mécanisme ait un rôle prépondérant et essentiel dans la défense antibactérienne chez les invertébrés. Les composants humoraux sont des molécules circulantes pouvant être produites par les hémoducytes eux même et qui semblent intervenir les premiers contre les particules étrangères

(Oubella et al., 1996). Ces substances peuvent directement être sécrétées par les hémocytes et agissent de manière coordonnée avec eux (comme le complément et les anticorps avec les lymphocytes chez les mammifères).

Enfin, les hémocytes possèdent une activité de type neuroendocrinienne. Cette activité interagirait directement avec la fonction immunitaire en modulant et souvent, en favorisant, la migration par chimiotactisme, la motilité et la phagocytose (Ottaviani et Franceschi., 1997 ; Malagoli et al., 1999 ; Ottaviani et al., 2001). Ces molécules sont connues chez les vertébrés pour être impliquées dans les mécanismes de réaction au stress et dans des processus inflammatoire.

C/ Rôle du calcium et mécanismes de signalisation impliqué dans la motilité, la migration par chimiotactisme et la phagocytose des hémocytes (figure 1).

Le calcium est un ion essentiel à la réalisation de nombreuses fonctions cellulaires. La fonction immunitaire et en particulier les mécanismes impliqués dans la réponses dite « innée » nécessite des réarrangements du cytosquelette suggérant l'implication des ions calcium. De nombreux auteurs ont d'ors et déjà mis en évidence leur rôle fondamental chez les cellules immunitaires de mammifères (neutrophiles et macrophages). Actuellement certaines études tentent de décrire ces mécanismes chez les cellules immunitaires d'invertébrés. Peu de données existent cependant concernant les hémocytes des mollusques bivalves.

Il apparaît ainsi que la voie des phosphoinositides soit impliquée dans les changements de forme, la migration et la phagocytose hémocytaire. Ainsi, la liaison d'une particule ou d'une bactérie à un récepteur couplé à une protéine G entraînerait le clivage du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) en diacylglycerol (DAG) et d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃). La fixation de l'IP₃ sur le R-IP₃ du réticulum endoplasmique est responsable du relargage du Ca²⁺ dans le cytoplasme. Le DAG, en activant une GTPase pourrait alors interagir avec le Ca²⁺ libéré pour activer et/ou recruter des protéines non identifiées actuellement (Yuan et al., 2000), mais probablement impliquées dans la régulation du cytosquelette et la formation de la vacuole de phagocytose (Seaston et al, 1998) mais aussi dans la motilité et la migration cellulaire (Imai et al., 2002). Des auteurs suggèrent d'autre part que le processus d'internalisation de la particule soit accompagné d'une migration du réticulum endoplasmique et de sa fixation autour de la vacuole d'endocytose par l'intermédiaire de protéines d'ancrages à l'actine comme la coronin et l'Aip1. Ce phénomène permettrait alors à des protéines liant le Ca²⁺ comme la careticuline ou la

calnexine (stockées dans le RE) de contrôler le niveau de calcium requis pour la formation du phagosome (Müller-Taubenberger., 2001).

Des études chez la moule *Mytilus galloprovincialis* ont d'autre part montrées que le DAG pourrait activer la protéine kinase C (PKC) alors responsable de la phosphorylation de résidus thréonine ou sérine de différents substrats cytoplasmiques. La voie de l'AMPc semble aussi participer à cette

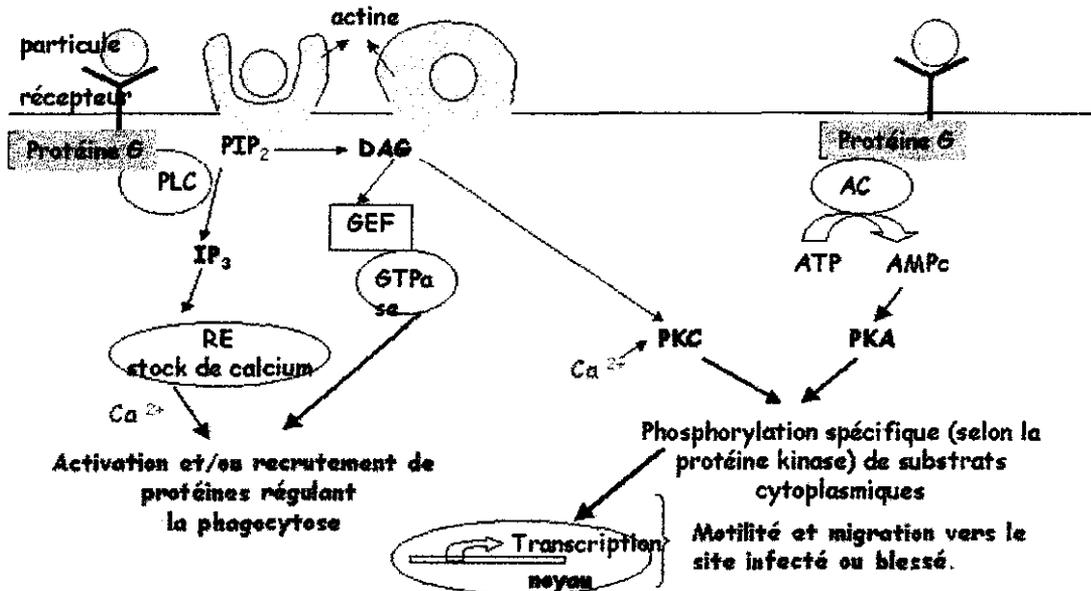


Figure 1 (modifié d'après Seaston et al., 98 et Ottaviani et al., 01) : Modèle décrivant les événements moléculaires probablement impliqués dans la motilité, la migration par chimiotaxie et la phagocytose hémocytaire chez les invertébrés.

PIP₂: phosphatidylinositol-4,5-biphosphate; IP₃:inositol 1,4,5 triphosphate; DAG: diacylglycérol; PLC: phospholipase C; RE: reticulum endoplasmique; PKC/A: protéine kinase C/ A; GEF: guanine exchange factor.

signalisation. Ainsi, l'adénylate cyclase (AC), en transformant L'ATP en AMPc entraînerait l'activation de la protéine kinase A, elle aussi responsable de la phosphorylation de substrats cytoplasmiques (Ottaviani et al., 2001).

Cette signalisation intracellulaire aboutirait alors à l'expression de certains facteurs de transcriptions tels que les protéines de la famille jun et fos ou encore la protéine smad qui, après fixation sur des complexes de transcription seraient responsables de la synthèse d'ADN impliqué dans la réorganisation de l'actine, la prolifération, la chimiotaxie et la survie cellulaire.

D/ Transferts calciques des hémocytes et implications dans la réponse immunitaire

(figure 2):De nombreuses similitudes concernant la transduction du signal existent entre les cellules immunitaires humaines impliquées dans les réponses inflammatoires et la phagocytose (types neutrophiles et macrophages) et les hémocytes d'invertébrés. Aussi les données existantes concernant les canaux calciques des cellules de mammifères constituent des bases de

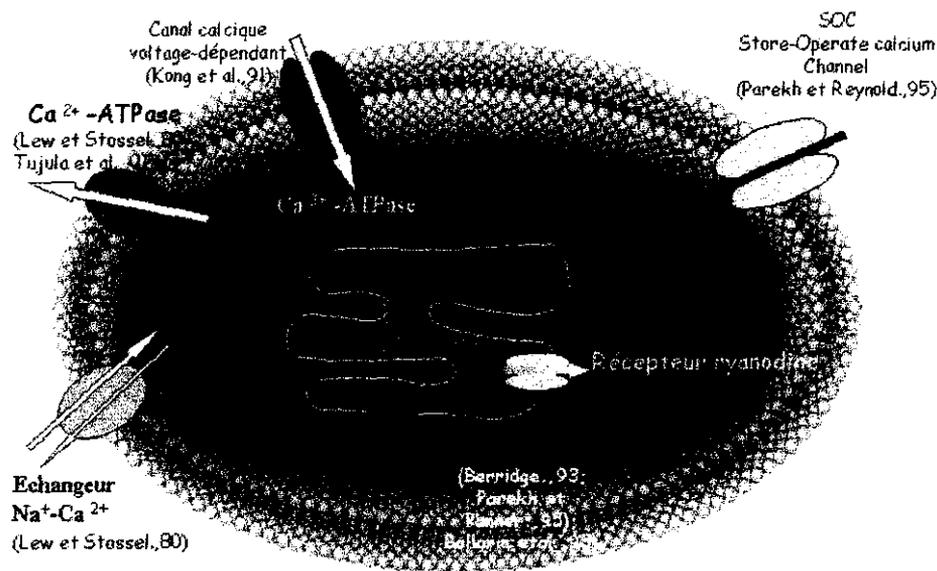


Figure 2 : Récapitulatif des canaux calciques pouvant participer aux variations calciques nécessaires au fonctionnement des cellules immunitaires impliquées dans la réponse « innée » chez les mammifères. La pompe Ca^{2+} -ATPase et le R-IP3 pourrait participer à la régulation calcique d'hémocytes d'invertébrés. RE = réticulum endoplasmique.

réflexion et d'études pour déterminer ceux existant au niveau des hémocytes de mollusques bivalves et en particulier de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

Chez les cellules immunitaires de mammifères, il est établi qu'une augmentation du calcium intracellulaire est nécessaire aux modifications du cytosquelette impliqués dans la chimiotaxie, la phagocytose et dans l'induction de la flambée oxydative (Marx and Maxfield, 1990 ; Thelen et al., 1993). De plus une série de mécanismes d'expulsion existent pour éviter les effets délétères d'une forte concentration en calcium dans le cytoplasme: pompe ATP-ase et échangeur sodium/calcium notamment. Une voie majeure d'entrée de calcium dans ces cellules serait constituée des SOCs (Store-Operated Ca^{2+} Channel) largement présents dans les lymphocytes et les macrophages (Pareck and Reinold., 1995 ; Parekh , 2002). L'entrée du calcium via les SOCs est contrôlée par la vidange calcique des stocks intracellulaires (Putney., 1986).

D'autres voies transmembranaires ont été décrites et en particulier des canaux dépendants du voltage, de type L, observés dans des cellules tumorales (type macrophage) de souris (Kong et al., 1991). Cependant il est à noter que la présence de calcium extracellulaire ne semble pas systématiquement nécessaire à l'activation de la phagocytose chez les cellules de mammifères (Thelen et al., 1993) suggérant le rôle prépondérant des stocks calciques intracellulaires dans ces mécanismes.

Chez les invertébrés, des travaux concernant l'exocytose du système pro-phényloxydase chez les hémocytes de certains invertébrés (*Styela plicata*), ont mis en évidence l'implication de la pompe Ca^{2+} -ATPase dans la polymérisation de la tubuline en microtubules (Tujula et al., 2001). Il a ainsi été montré que le tributyl étain (TBT), un inhibiteur de la calmoduline (régulateur subcellulaire du calcium), perturbait le système de signalisation impliquant l'activité Ca^{2+} -ATPase et a fortiori la polymérisation des protéines de tubuline en microtubules. De plus des études réalisées

sur l'ascidien *Botryllus schlosseri* (Ballarin et al., 1998) ont montré l'importance des R-IP₃ dans ces mécanismes. Par contre aucun effet n'a été observé avec la ryanodine et la caféine suggérant l'absence de R-Rya chez cette espèce d'invertébrés. De la même manière, les canaux de type L ne sembleraient pas jouer un rôle dans la phagocytose.

E/ Effets de certains polluants sur le système immunitaire des huîtres.

Des effets de contaminants métalliques (métaux lourds type Cd, Mg, Cu) et organiques (atrazine) sur les fonctions immunitaires de mollusques bivalves ont été rapportés dans la littérature (Oubella., 1996; Gagnaire et al., 2003). Les polluants incriminés proviennent des rejets issus des activités industrielles, agricoles ou urbaines. Ainsi, certaines études ont révélé que l'exposition des huîtres à des doses sub-létales d'ions métalliques (Cd²⁺ et Cu²⁺) largement retrouvés près des côtes modifiait l'hémocytose (augmentation du nombre d'hémocytes nécessaire à la lutte contre le pathogène) ainsi que la formule hémocytaire (Oubella et Auffret). D'autre part, il a été montré que l'activité phagocytaire se trouvait réduite en présence de concentrations élevées en mercure, cuivre, aluminium, cadmium et en présence de faibles concentrations de tributylétain (Fisher et al., 1990). Il semblerait en outre que des concentrations élevées en cuivre endommageraient la membrane du lysosome contenant les enzymes hydrolytiques participant à la dégradation des particules étrangères lors de la phagocytose (Nicholson., 2000). Des études récentes ont d'autres part mis en évidence les effets délétères de "cocktails" de pesticides retrouvés dans le Bassin Marennes-Oléron sur l'activité phagocytaire et enzymatique des hémocytes de l'huître *Crassostrea gigas* (Gagnaire et al., 2003). Enfin le mécanisme d'agrégation spontanée des hémocytes d'huître et de moule (mécanisme essentiel à l'immobilisation du pathogène ayant envahi l'hôte) est inhibé en présence de 400ng/l de TBT et 10µg/l de Cd²⁺. Cet effet, comparable à celui de l'EDTA, suggère que certains métaux interférerait directement avec l'homéostasie calcique intra-hémocytaire.

Le système immunitaire des bivalves pourrait donc être affecté par une exposition à certains types de polluant (effet dépendant de la concentration de polluant et du temps d'exposition de l'organisme à ce polluant). Il est actuellement suggéré que certains polluants pourraient contribuer à rendre les mollusques plus sensible à certaines attaques de pathogènes.

MATERIELS ET METHODES

A/ Matériel biologique

1/ Les huîtres

Les huîtres utilisées dans ce travail sont des animaux d'un an, produits en 2001 à l'écloserie IFREMER de La Tremblade (Charente Maritime). Les animaux ont été maintenus en bassin béton alimenté en continu en eau de mer à la station IFREMER de La Tremblade jusqu'à leur expédition (Chronopost) au laboratoire de Poitiers. A leur réception, les huîtres sont placées dans un bac contenant de l'eau de mer oxygénée à 14-15°C et un système de filtration élimine les déchets. Un à deux jours d'acclimatation sont nécessaires avant chaque expérimentation pour limiter les effets du stress induit par le transport.

2/ Ponction de l'hémolymphe

La ponction d'hémolymphe est réalisée à travers la membrane péricardique. A ce niveau le cœur baigne dans l'hémolymphe. Une seringue de 1 ml munie d'une aiguille stérile de 25 mm de longueur et de 0.6 mm de diamètre sont utilisées pour ne pas léser les cellules. Les hémocytes sont conservés dans la glace le temps du prélèvement.

3/ Préparation des cellules

a/ Pour la cytométrie de flux:

L'hémolymphe est centrifugée pendant 10 minutes à 4°C et 1500 g/minute. Le surnageant est éliminé. La concentration en hémocytes du culot est évaluée par comptage sur lame de Malassez. Le culot est ensuite repris dans de la Solution Physiologique (SP) (tableau I) ou dans l'hémolymphe de manière à obtenir 1 million de cellules/ml. La suspension cellulaire est ensuite divisée en aliquots de 200 μ l. Les échantillons sont alors placés à 18°C pendant 30 minutes ou 3h30.

b/Pour la cytofluorimétrie et la microscopie confocale:

Après la ponction, 500 μ l d'hémolymphe sont placés dans une boîte de Pétri fond verre (35 mm) La poly-L-lysine (BIOCHROM AG) est utilisée comme facteur d'attachement (temps de contact 10 minutes puis rinçage à l'eau désionisée). Les cellules sont mises à adhérer 30 minutes à température ambiante. Puis la sonde Indo-1-AM est ajoutée (6 μ M au final) pendant 45 minutes à l'obscurité pour les expériences en cytofluorimétrie. La sonde Fluo-4-AM est ajoutée (6 μ M) pendant 15 minutes à l'obscurité pour les expériences en microscopie confocale.

	SP SOLUTION PHYSIOLOGIQUE en mM	200K en mM	0 Ca Solution de Calibration en mM	20 Ca Solution de Calibration en mM
NaCl	458	268.5	458	458
KCL	10.5	200	10.5	10.5
CaCl ₂ , 2H ₂ O	10.5	10.5	0	20
MgCl ₂ , 6H ₂ O	28	28	28	28
MgSO ₄ anhydre	22	22	22	22
HEPES	5	5	5	5
EGTA			1	
ionomycine			0.02	0.02

Tableau I : Composition des solutions perfusées dans l'environnement externe des hémocytes. Le pH des solution est ajusté à 7.4 (Malagoli et al., 1999) avec du Tris base. L'osmolarité des solutions est vérifiée dans chacun des cas avec un osmomètre fonctionnant par détermination de point de congélation. Elle doit être d'environ 1000 mOsmoles.

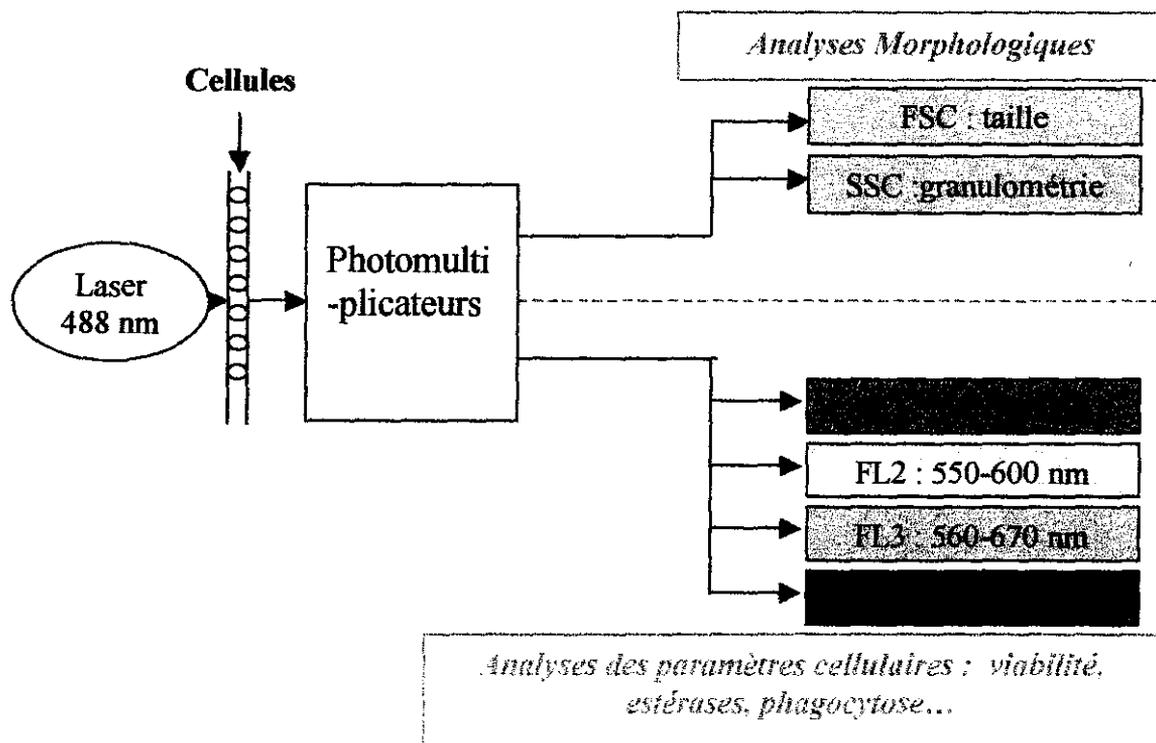


Figure 3 : les différentes possibilités d'analyse multiparamétrique de cellules isolées en cytométrie de flux.

B/ Techniques d'analyse

1/ Cytométrie de flux

a/principe

La cytométrie de flux consiste à étudier certaines caractéristiques physico-chimiques de cellules ou de particules entraînées dans un flux liquide. Les cellules passent une à une devant un laser de longueur d'onde précise. Les informations sont obtenues soit de manière directe par diffraction de la lumière du laser, soit de manière indirecte, lorsque des marquages sont réalisés (fluorochromes et/ou anticorps monoclonaux et polyclonaux), par l'enregistrement de la fluorescence réémise par la sonde.

La cytométrie de flux intègre trois systèmes principaux gérés par informatique : fluïdique, optique et électronique.

Lors de l'injection des cellules, le liquide de gaine coaxial (solution saline isotonique) exerce une pression sur le flux central contenant les cellules, ce qui permet leur alignement. Elles passent ainsi une par une devant la source lumineuse (Figure 3). Cet écoulement est qualifié de laminaire. Le système optique permet de focaliser un ou plusieurs faisceau(x) laser sur le flux par le biais de lentilles. Il s'agit ici d'un laser argon produisant une lumière monochromatique de 488 nm. La fluorescence émise par les cellules est alors transmise par l'optique de réception (comprenant miroir dichroïques et filtres) vers les détecteurs (photomultiplicateurs et photodiodes) qui sont chargés de convertir les signaux lumineux en signaux électriques (courants puis tension). Ceux ci sont ensuite triés et répartis en fonction de leur voltage respectif. Les signaux de même voltage sont répartis dans un même canal (il existe au maximum 1024 canaux allant de 0.01V à 10,24V). Les données analogiques sont ensuite digitalisées par le système électronique et visualisables sur PC sous forme d'histogrammes (Figure 4) ou de cytogrammes (Figure 7 à droite).

Les mesures directes de diffraction de la lumière (modification de la direction, sans modification de la longueur d'onde) par les cellules non marquées permettent d'obtenir l'empreinte morphologique de chaque cellule par le biais de deux paramètres :

- la taille (FSC : Forward Scatter height) obtenue pour une diffraction inférieure à un angle de 10°.
- La complexité (SSC : Size Scatter height) pour une diffraction inférieure à 90°.

Les analyses concernant les cellules marquées se basent sur la capacité des cellules, excitées à une longueur d'onde donnée, à émettre un rayonnement à une longueur d'onde différente.

L'appareil utilisé dispose pour cette application de quatre lentilles permettant la réception de quatre longueurs d'ondes différentes: le vert de 500 à 550 nm (détecteur FL1), le jaune de 550 à

600 nm (FL2), l'orange et le rouge de 560 à 670 nm (FL3), et le rouge de 640 à 700 nm (FL4) (Figure 1).

b/ Paramètres hémyocytaires analysés

L'étude de chaque activité s'est faite sur une base de 3 000 événements analysés. Les résultats se présentent sous forme de cytogramme représentant la taille (FSC), la complexité (SSC) et le canal de fluorescence de l'activité testée (Figure 3).

***Viabilité des cellules :** elle est testée grâce à l'iodure de propidium (IP- Interchim -1 mg/l), un fluorochrome qui se fixe à l'ADN et à l'ARN uniquement lorsque la membrane est lésée. 200 μ l d'hémolymphe sont mis à incuber avec 5 μ l d'IP pendant 30 min à l'obscurité et dans la glace. Les cellules mortes émettent une fluorescence rouge captée par le photomultiplicateur FL3.

***Phagocytose :** elle est testée grâce à des billes synthétiques de 1 μ m de diamètre (Interchim) marquées à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). 10 μ l sont ajoutés à 200 μ l d'hémolymphe. L'incubation est de 1h30 à température ambiante et à l'obscurité. Les cellules ayant phagocyté les billes émettent une fluorescence verte détectée en FL1. On considère qu'il y a phagocytose lorsque les cellules présentent une fluorescence identique ou supérieur à la valeur de fluorescence de trois billes (Figure 4).

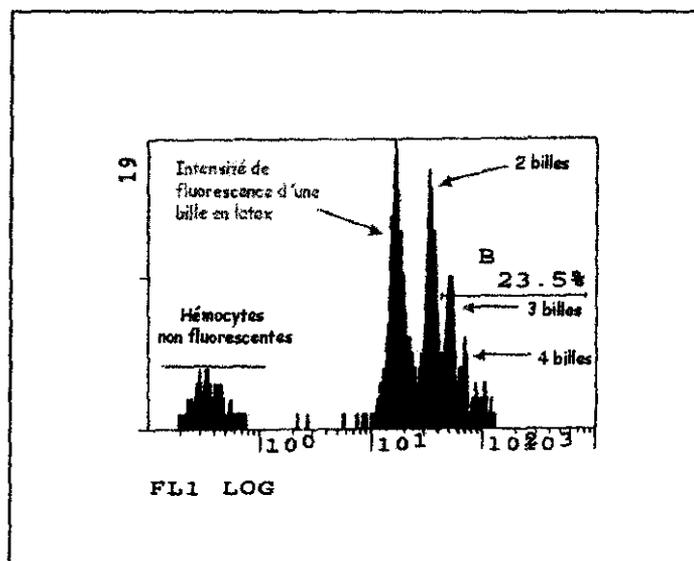


Figure 4 : Histogramme de fluorescence (FL1) rapportant les résultats de phagocytose des billes pour les hémocytes de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Ordonnée=nombre d'événements comptés. Abscisse= intensité de fluorescence (échelle log).

***Estérases :** l'activité des estérases est déterminée grâce à l'utilisation du kit « Cell Probe fluoresceine diacetate (FDA) Esterase » (Beckman Coulter). L'émission de fluorescence n'a lieu que quand le substrat estérifié des estérases (ayant pénétré dans l'hémocyte) est clivé par

l'enzyme. L'intensité de fluorescence est fonction de la quantité d'estérases présentes. On ajoute 20 μ l du kit à 200 μ l d'hémolymphe. L'incubation est de 15 min à température ambiante et à l'obscurité.

c/ Les substances et milieux testés en cytométrie de flux

On peut distinguer deux types de test. Le premier consiste à contrôler qu'un certain nombre de composés utilisés lors de l'expérimentation (notamment en cytofluorimétrie et en microscopie confocale) n'interfèrent pas de façon significative avec l'objet de l'étude: DMSO et sondes calciques par exemple. Le second participe à l'étude elle-même: les modulateurs calciques font partie de ce type. Quant aux milieux SP et Hémolymphe ils font partie des deux types puisqu'il s'agissait à la fois de choisir le meilleur milieu pour l'étude et de vérifier qu'un milieu artificiel pouvait convenir.

*Test du milieu SP et de l'hémolymphe: les hémocytes ont été mis à incuber dans de l'hémolymphe et dans du SP pour comparer l'effet du SP sur la viabilité, les activités phagocytaires et enzymatiques des hémocytes par rapport au milieu contrôle naturel qui est l'hémolymphe.

*Test du DMSO: le DMSO est utilisé pour solubiliser les sondes fluorescentes (Indo-1-AM et Fluo-4-AM). Une gamme de 4 concentrations de DMSO (préparée dans le SP) a donc été réalisée pour évaluer son effet (mortalité et activité estérases) sur les hémocytes (1/800; 1/400; 1/200 et une valeur extrême de 1/5). Cette gamme est faite dans du SP. Les analyses en cytométrie de flux sont réalisées à 30 minutes et à 3h30 pour avoir une idée de l'effet du DMSO sur des temps d'incubation long avec les hémocytes. Dans chacun des cas, les échantillons sont répliqués 3 fois et l'expérience réalisée 3 fois pour avoir une analyse statistique fiable.

*Test des sondes fluorescentes: l'effet de l'indo-1-AM est testé à deux concentrations différentes: 3 μ M et 6 μ M après 3/4h de mise en contact avec les hémocytes. L'effet de la sonde calcique Fluo-3-AM a été également testé à trois concentrations différentes 2.5, 5 et 10 μ M après 30 minutes d'incubation.

*Test des modulateurs calciques sur le niveau de calcium intracellulaire et sur les capacités de phagocytose des hémocytes:

- Le BAPTA-AM est un chélateur calcique. Il permet d'abaisser la concentration calcique intracellulaire et donc aussi de vérifier que nos dispositifs expérimentaux de mesure du calcium sont bien capables d'enregistrer une telle diminution. Après avoir mis les

hémocytes à incuber avec le fluo-3-AM (10 μM) pendant 30 minutes à 18°C ou avec les billes de phagocytose, le BAPTA-AM est mis à agir 30 minutes à 10 μM .

- La ryanodine est un activateur de la libération du calcium contenu dans les stocks internes sensibles à la ryanodine (Récepteurs RyR). Après avoir mis les hémocytes à incuber avec le fluo-3-AM (10 μM) ou avec les billes de phagocytose pendant 50 minutes à 18°C, la ryanodine à 5 μM est ajoutée et mise à incuber 10 minutes avec les hémocytes.

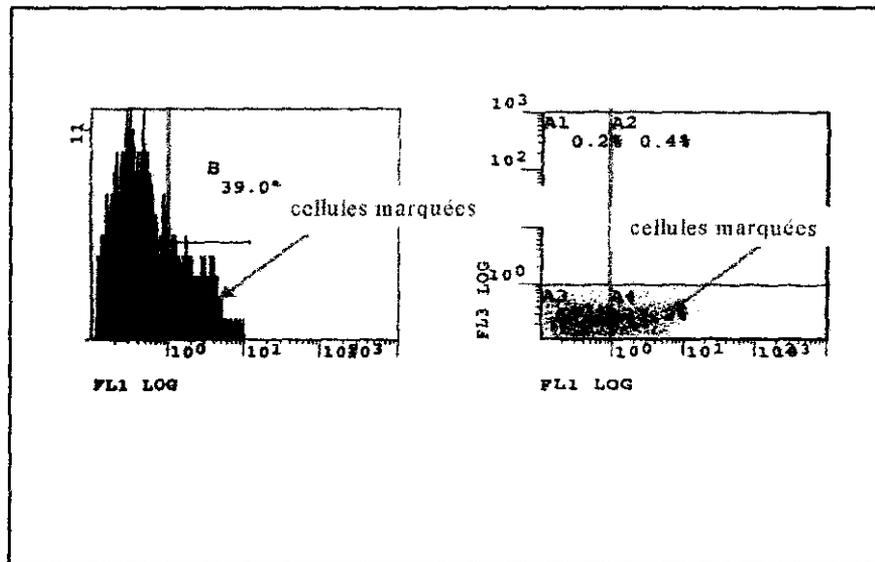


Figure 5: Histogramme (à gauche) et cytogramme (à droite) de fluorescence représentant le nombre d'hémocytes marqués et non marqués par le fluo-3- Ca^{2+} .

d/ Mesure du calcium

La mesure du calcium a été réalisée grâce à la sonde fluo-3-AM (voir figure 5) sur environ 3000 hémocytes par échantillon (nombre d'échantillons = 9). Sa partie AM (AcétoxyMéthylester) lui permet de franchir la double couche lipidique. Une fois dans la cellule, les estérases clivent la molécule et libère le fluo-3 sous forme active, capable de se lier au calcium. Cette sonde est excitée dans le visible (un maximum d'absorption sous forme liée à la longueur d'onde de 506 nm) et un maximum d'émission sous forme liée à 526 nm. La fluorescence est détectée en FL1. Le positionnement d'un seuil (lignes rouges sur la figure 5) permet de classer les cellules en cellules "marquées" et "non marquées". Ainsi lorsque le calcium augmente, la proportion de cellules "marquées" augmente (déplacement de l'histogramme vers la droite).

2/ Cytofluorimétrie (OSP 100 Olympus)

a/ Principe de la méthode ratiométrique

Les cellules sont chargées dans un milieu de base contenant 6 μM Indo-1-AM (AcetoxyMéthylester) (Sigma) pendant 45 minutes à l'obscurité et à température ambiante. Il s'agit de l'Indo-1-AM, dont la partie ester lui permet de franchir facilement la double couche phospholipidique membranaire. Une fois dans le cytoplasme les estérases présentes dé-estérifient la sonde qui est alors piégée dans la cellule. Cette sonde fluorescente a alors une affinité pour le calcium. Ainsi, la proportion de sonde sous forme liée et sous forme libre est fonction de la concentration de calcium cytoplasmique présent dans l'hémocyte. L'indo-1 est une sonde calcique à simple excitation / double émission (Figure 6).

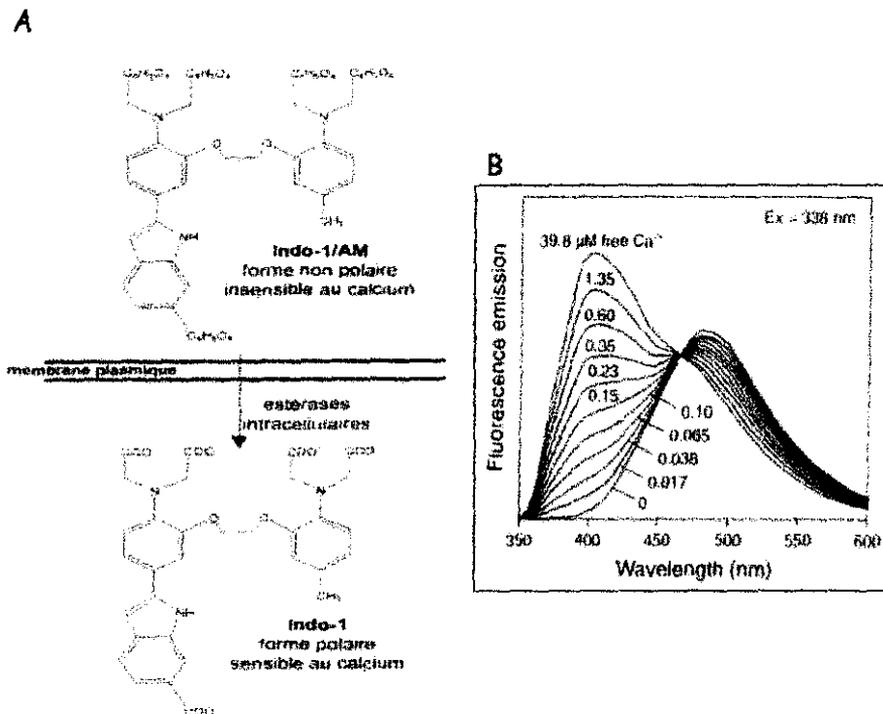


Figure 6: A/Structure chimique de l'Indo-1-AM et de L'Indo. B/Spectre d'émission de la sonde Indo-1 en fonction de la concentration calcique interne. Les deux pics correspondent à la forme liée au calcium (405 nm) et à la forme libre (485 nm).

Après avoir été excitée dans l'ultraviolet à 350 nm, la sonde émet à deux longueurs d'onde différentes : 405 nm lorsqu'elle est sous forme liée (Indo-1-Ca) et 485 nm sous forme libre (Indo-1). L'enregistrement de la fluorescence émise à 405 nm et à 485, permet d'obtenir un ratio : $R = F_{405} / F_{485}$. Le rapport obtenu permet, après calibration, de calculer la concentration intracellulaire en calcium.

L'enregistrement de la forme liée et libre de la sonde calcique ainsi que le ratio se fait par un appareillage de cytofluorimétrie, l'OSP 100 Olympus (figure 7).

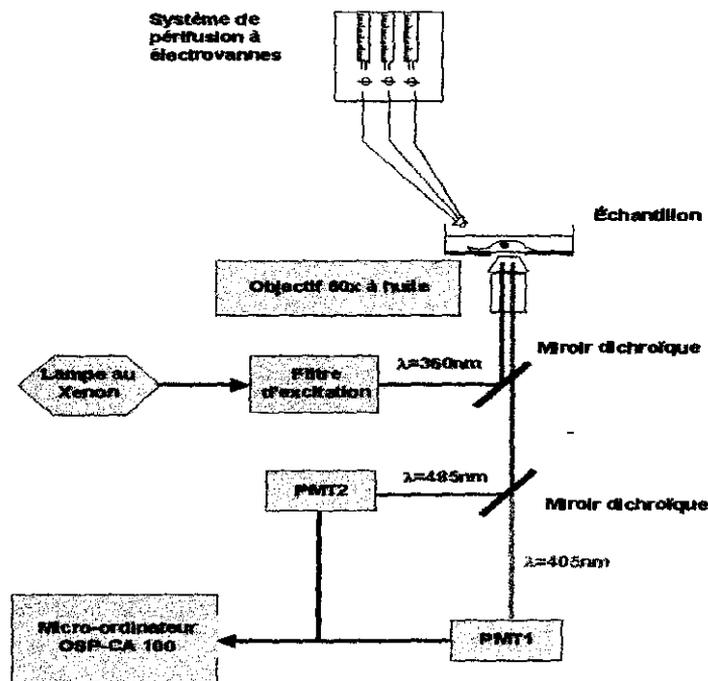


Figure 7: Principe de fonctionnement du cytofluorimètre OSP 100 Olympus

Ce système ratiométrique présente l'avantage d'éliminer certains artéfacts liés au photobleaching ou photolyse (destruction de la sonde), à la fuite de la sonde, au phénomène de compartimentalisation, au déplacement et à l'épaisseur variable de la cellule, à l'absorption de la fluorescence par certaines molécules testées (caféine par exemple, O'Neill et al., 1990). Du fait de son pouvoir tampon vis-à-vis du calcium (molécule dérivée d'un chélateur calcique (EGTA)), elle devra être utilisée à faible concentration sous peine de modifier la concentration calcique que l'on veut mesurer.

b/ Détermination des paramètres de calibration

Si l'on souhaite estimer la concentration absolue de calcium dans la cellule on devra convertir le ration R de fluorescence en calcium par l'intermédiaire de l'équation de Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985) :

$$[Ca]_i = K_d \cdot \beta \cdot (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

Cette équation permet de déterminer la quantité de calcium intracellulaire $[Ca]_i$.

K_d est la constante de dissociation de l'Indo-1-AM d'avec le calcium.

R_{min} : rapport minimal de fluorescence forme liée /forme libre. Il s'obtient en perfusant une solution sans calcium (Tableau I) et contenant de la ionomycine (ionophore calcique qui augmente la perméabilité de la membrane au calcium) et de l'EGTA à 1 mM (chélateur de calcium).

R_{max} : rapport maximal de fluorescence forme liée / forme libre. Il s'obtient en perfusant la solution à 20 mM de calcium et de la ionomycine (Tableau I).

β : rapport des valeurs de fluorescence à 485 nm en $0Ca$ et à saturation (20 Ca).

c/ Détermination du K_d de l'Indo-1-AM

Pour avoir une idée du K_d de la sonde calcique dans l'hémocyte, nous avons choisi de reconstituer le milieu intracellulaire des hémocytes de manière artificielle en tenant compte des informations existant dans la littérature à ce sujet. En effet, il semble que les invertébrés possèdent dans leurs cellules une quantité importante de composés organiques (contrairement aux cellules de mammifères) tels que des acides aminés (proline, glycine, alanine, sérine, acide glutamique ou aspartique) des polyols et des sucres. Ces composés seraient responsables de la forte osmolarité intracellulaire dans ces cellules. Le milieu synthétique mimant le milieu intra-hémocytaire a été synthétisé avec 470 mM d'acide glutamique, 10 mM de NaCl, 4 mM de $MgCl_2$, 20 mM d'HEPES, 3 mM d'EGTA. Le tout était ajusté au pH 7.4 avec de la potasse KOH (Curtis et al., 1999). Une gamme étalon de calcium a été réalisée, huit concentrations ont ainsi été testées: 33 nM, 100 nM, 333 nM, 1 μM , 33 μM , 100 μM , 333 μM et 1 mM. La quantité de calcium à mettre pour obtenir précisément les concentrations calciques souhaitées a été obtenue grâce à l'utilisation du logiciel MaxChélateur (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>). Les mesures ont été réalisées en utilisant la sonde calcique Indo-1 sous forme de sel (Sigma) à 4 concentrations: 0.025 μM , 0.25 μM , 2.5 μM et 25 μM . Les mesures du K_d ont été obtenues grâce à l'utilisation du logiciel Prism (Prism 3.0; <http://www.graphpad.com>).

d/Test des modulateurs calciques sur le niveau calcique intracellulaire des hémocytes

*Solution hyperpotassique (Tableau I): cette solution est couramment utilisée pour mimer la dépolarisation physiologique subie par la cellule *in vivo* (Gomez et al., 1994). La cellule répond à cette stimulation en mettant en jeu l'ensemble des mécanismes voltage-dépendants responsables de l'augmentation en calcium intracellulaire. Cette solution est perfusée directement sur la cellule sélectionnée.*Caféine (10 mM): Elle se fixe au niveau des récepteurs à la ryanodine du réticulum endoplasmique et permet la libération des stocks intracellulaires (Hove et al., 1998;

Harwood et al., 2000). Cette solution est également directement perfusée sur la cellule sélectionnée.

3/ Microscopie confocale (BioRad 1024 MRC)

Les hémocytes sont mis à incuber à température ambiante pendant 15 minutes avec la sonde calcique fluo-4-AM qui, comme l'Indo et le fluo-3 est hydrolysée dans la cellule par les estérases, rendant le fluo-4 disponible pour lier le calcium. Le Fluo-4 est excitée à 494 nm par le laser et émet autour de 516 nm lorsqu'il est lié au calcium (Figure 8). L'intensité de fluorescence augmente avec la concentration calcique intracellulaire. Cette analyse ne nous permet pas de quantifier le calcium intracellulaire mais nous permet de visualiser les mouvements calciques, d'analyser leur localisation et leur répartition spatiale. Les images sont des coupes horizontales de la cellules au cours du temps. La fréquence d'acquisition est d'une seconde. Ayant eu que peu recours à cette technique celle-ci, faute de place, n'est pas décrite plus avant.

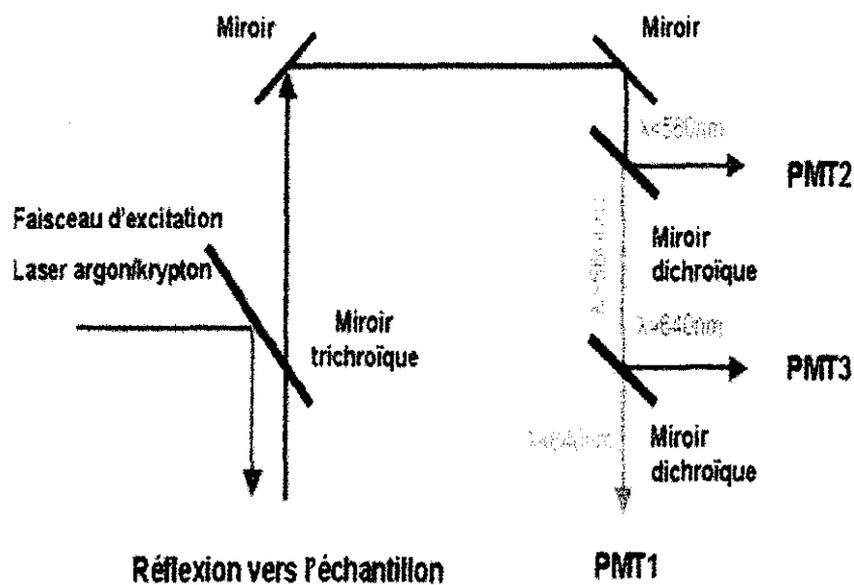


Figure 8: Représentation schématique du principe de fonctionnement du microscope BioRad 1024 MRC.

4/ Analyse statistique

Dans la partie résultat les données sont moyennées plus ou moins l'écart-type. Comme nous ne connaissons pas la distribution des données (Gaussienne ou non), l'analyse statistique est réalisée en utilisant des tests non paramétrique. Le test de Mann-Whitney U-test est utilisé pour tester la significativité de l'effet d'un produit par rapport au contrôle. Le test de Kruskal-Wallis est utilisé pour tester la significativité de l'effet dose de l'Indo-1-AM par rapport au contrôle.

RESULTATS

A/Analyse en cytométrie de flux

1/Analyse préliminaire vérifiant l'inocuité des produits utilisés en cytofluorimétrie et microscopie confocale sur la viabilité et certaines activités hématocytaires.

Les résultats (Figure 9) mettent en évidence un effet de la solution physiologique (SP) sur les hématocytes par rapport à l'hématolymphe (H), le milieu naturel des hématocytes. Ainsi, la mortalité des hématocytes passe de 9% en H à 5.7% en SP (Figure 9A), le pourcentage de cellules présentant des activités estérases passe de 40.7% en H à 68% en SP (Figure 9B) et le pourcentage de cellules présentant des activités phagocytaires passe de 25% en H à 21% en SP (Figure 9C). De plus les tests réalisés sur les activités aminopeptidases (résultats non présentés) montrent que le pourcentage de cellules présentant des activités aminopeptidases passe de 85% en H à 13% en SP. La concentration de DMSO utilisée en cytofluorimétrie pour diluer les sondes calciques est de 1/400. Les effets du DMSO 1/400 ne diffèrent pas des effets du SP suggérant que les variations observées sont le fait du SP dans lequel le DMSO était préparé.

La figure 10 indique que la sonde calcique Indo-1-AM ne semble pas affecter la viabilité et la phagocytose des billes en hématolymphe (H) ou en SP après 45 minutes d'incubation. Par contre, il semble que l'Indo-1-AM puisse induire une légère diminution du pourcentage de cellules présentant des activités estérases en fonction de la concentration quand les hématocytes sont dans le SP. Cette série d'expériences ne met pas en évidence de différences significatives entre les hématocytes mis à incuber dans SP et l'hématolymphe (H) pour ce qui concerne la mortalité et la phagocytose des billes (contrairement à la figure 9). Par contre l'effet du SP sur les activités estérases des hématocytes demeure (le pourcentage de cellules présentant les activités estérases passe de 35% en SP à 56.6% en hématolymphe) (Tableau II).

Enfin, la figure 11 indique que la sonde calcique fluo-3-AM affecterait la viabilité hématocytaires dans l'hématolymphe, en fonction de la concentration. L'effet est également observé dans le SP mais le pourcentage d'hématocytes morts n'augmente pas avec la concentration de sonde.

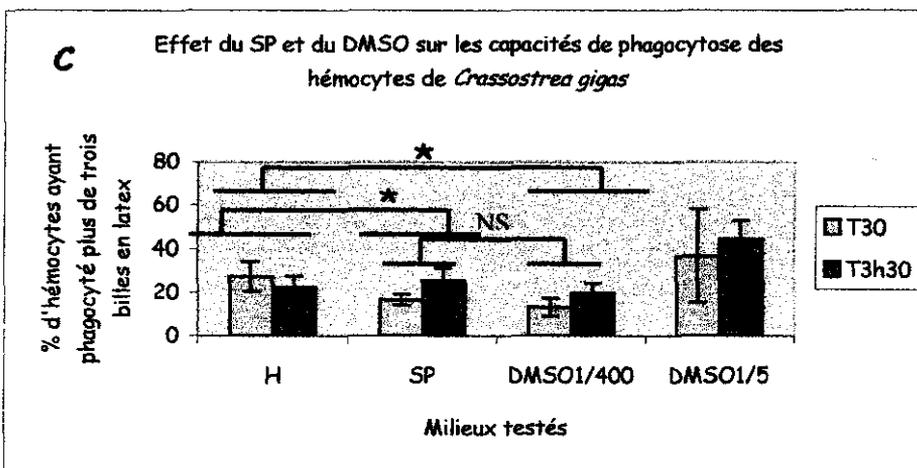
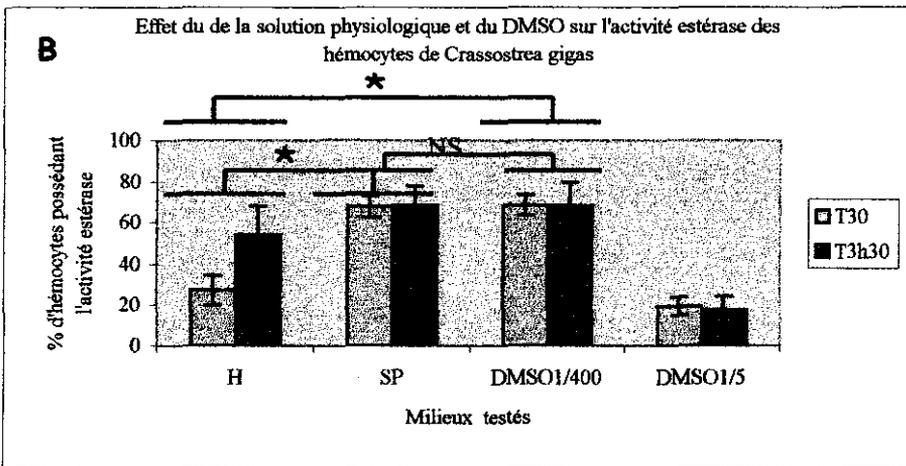
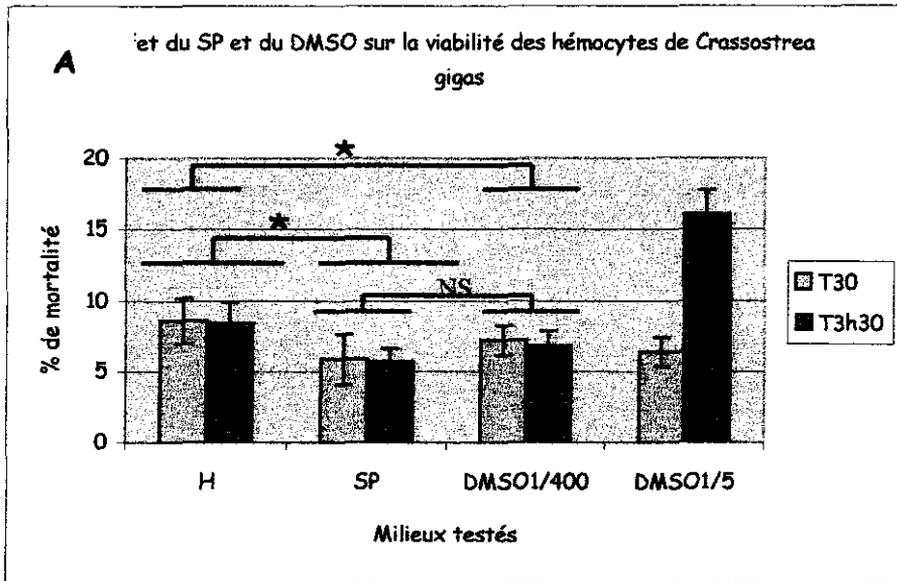


figure 9: Effet de la solution d'eau de mer reconstituée (SP) et du DMSO sur la viabilité, l'activité estérase et phagocytaire des hémocytes de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. H=hémolymphe. L'hémolymphe est la valeur de référence. *= test de Mann Whitney significatif à $0.05 < p < 0.01$. NS=différence non significative. Chaque histogramme est la moyenne des résultats obtenus pour 9 échantillons testés plus ou moins l'écart type.

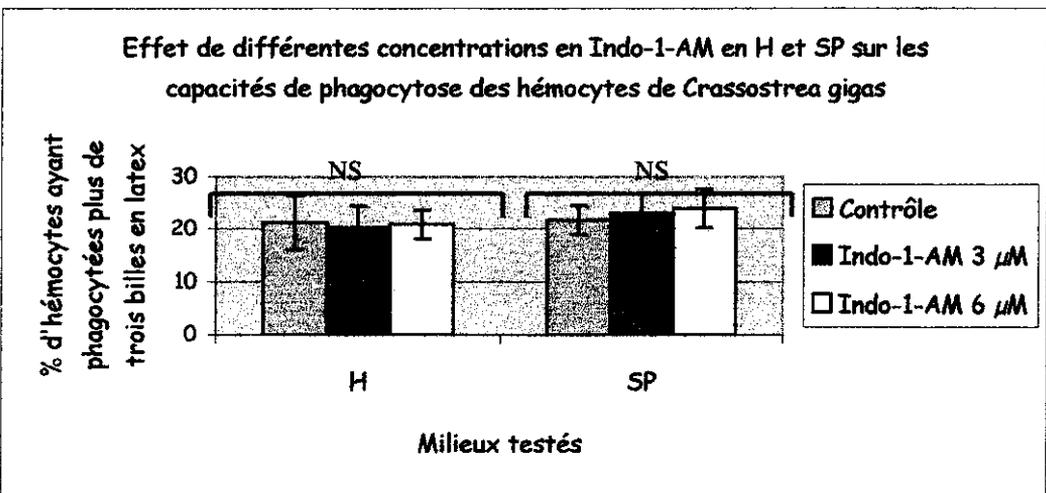
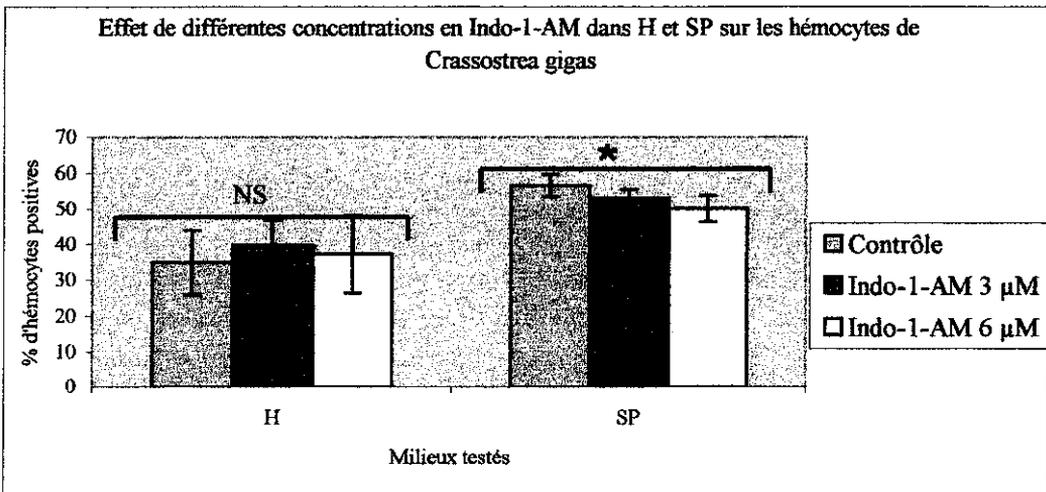
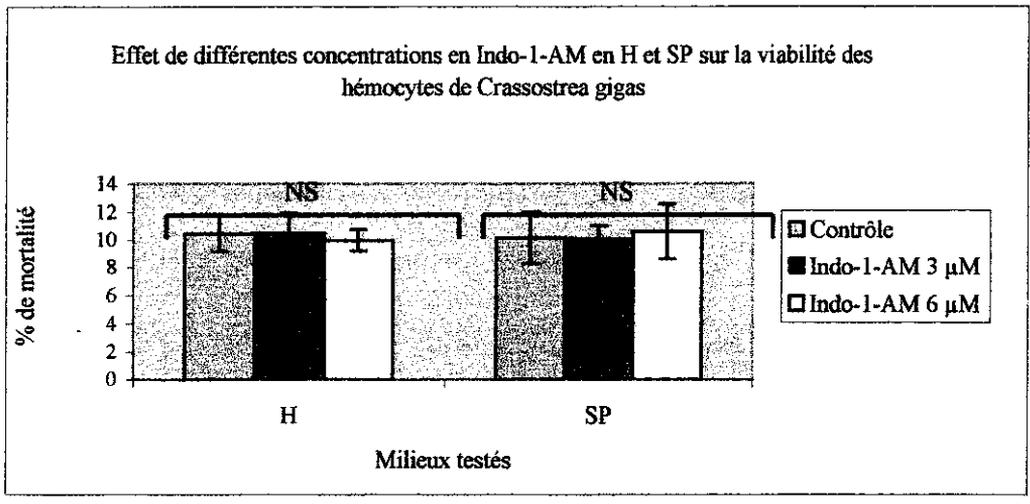


figure 10: Effet de la sonde Indo-1-AM à 3 μM et 6 μM sur la viabilité, l'activité estérases et phagocytaire des hémocytes de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. H= hémolymphe; SP= Solution Physiologique (eau de mer reconstituée). *= test de Kruskal Wallis significatif pour 0.05<p<0.01. Chaque histogramme est la moyenne des résultats obtenus pour 6 échantillons testés plus ou moins l'écart type.

tableau II : Test de comparaison de l'effet de fluo-3-AM entre les milieu SP (Solution Physiologique) et H (Hémolymphe). En vert pour la mortalité, en rouge pour les activités estérases, en bleu pour les activités phagocytaires. *= test de Mann Whitney significatif pour $0.05 < p < 0.01$. **= test de Mann Whitney significatif pour $0.01 < p < 0.001$. NS= Non significatif.

	SP	SP 3 μM indo-1-AM	SP 6 μM indo-1-AM
H	NS ; **; NS		
H 3 μM indo-1-AM		NS ; **; NS	
H 6 μM indo-1-AM			NS ; *; NS

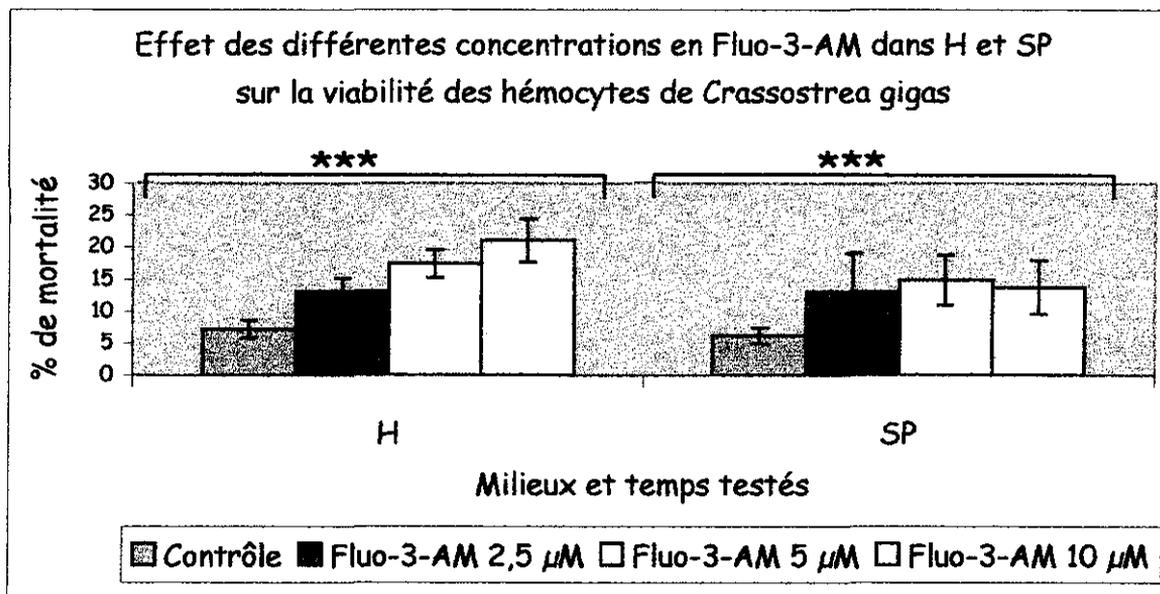


Figure 11: Effet de la sonde calcique fluo-3-AM à trois concentrations différentes sur la viabilité des hémocytes de *Crassostrea gigas*. H= hémolymphe; SP= Solution Physiologique. ***= test de Kruskal-Wallis significatif pour $0.01 < p < 0.001$. NS= différence non significative. Chaque histogramme est la moyenne des résultats obtenus pour 9 échantillons testés plus ou moins l'écart type.

2/ Effets de modulateurs calciques sur la concentration calcique intracytoplasmique, testés grâce à la sonde calcique Fluo-3-AM. Effets de ces mêmes modulateurs sur l'activité phagocytaire des hémocytes testés grâce aux billes en latex.

a/ Effets d'un chélateur, le BAPTA-AM et d'un stimulateur de la libération calcique, la ryanodine sur le $[\text{Ca}^{2+}]$ intracytoplasmique hémocytaire.

Les mesures indiquent encore une fois l'effet non négligeable du milieu artificiel SP sur les hémocytes par rapport à leur milieu naturel : l'hémolymphe. En effet, l'effet des modulateurs

sur le calcium intracellulaire (figures 12A et 13A) semble exacerbé en SP par rapport à l'hémolymphe. Il apparaît cependant que ces modulateurs agissent sur le $[Ca^{2+}]$ intracytoplasmique dans les deux milieux. En présence de BAPTA, le pourcentage de cellules marquées par le fluo-3 diminue d'environ 46 % en SP et de 20 % en H. En présence de ryanodine, le pourcentage de cellules marquées augmente d'environ 53 % en SP et de 36 % en H. A noter cependant, le faible pourcentage de cellules marquées.

b/Effets du BAPTA-AM et de la ryanodine sur les capacités de phagocytose des hémocytes

Les capacités de phagocytose des billes en latex semblent diminuer en présence de BAPTA en hémolymphe (-13 %) et en SP (-6%) mais la différence n'est pas significative en SP (figure 12B). Par contre même si l'on observe une légère augmentation de la phagocytose en présence de ryanodine (figure 13B) en hémolymphe (+4.5%) et en SP (+6.6 %), ces variations ne sont pas significatives dans les deux milieux.

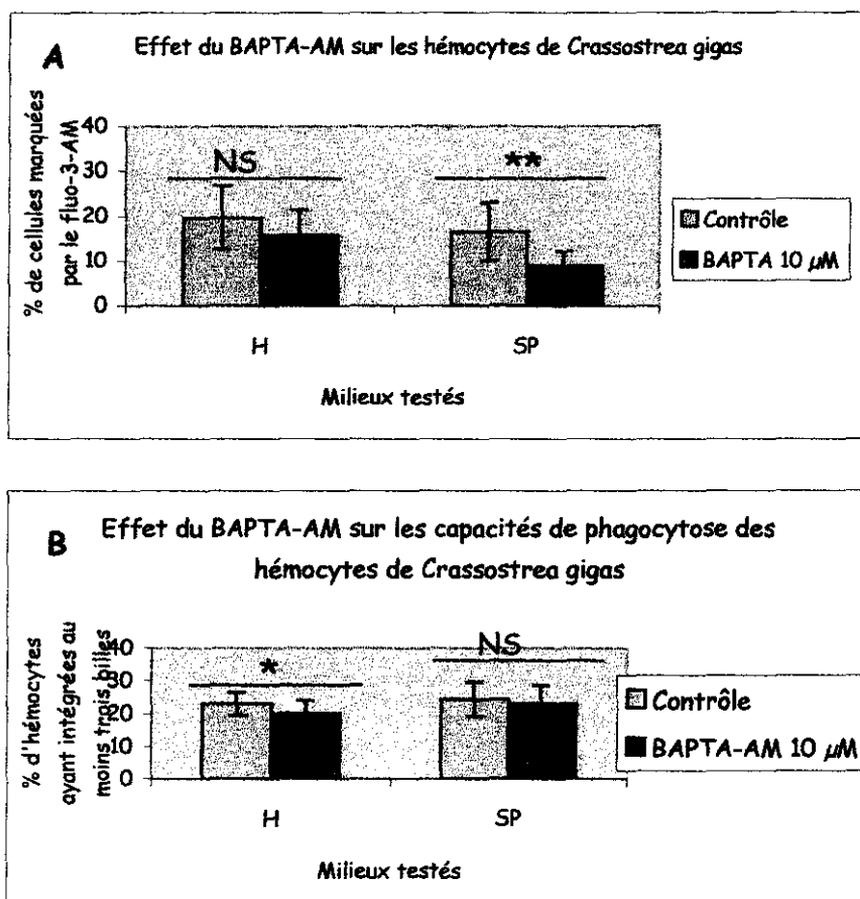


figure 12: Effet du chélateur calcique BAPTA-AM (5 µM) sur le calcium intracellulaire (A) et les capacités de phagocytose (B) des hémocytes de *Crassostrea gigas*. * = test de Mann Whitney significatif pour 0.05 < p < 0.01. ** = test de Mann Whitney significatif pour 0.01 < p < 0.001. NS = différence non significatif. Chaque histogramme est la moyenne des résultats obtenus pour 9 échantillons testés plus ou moins l'écart type.

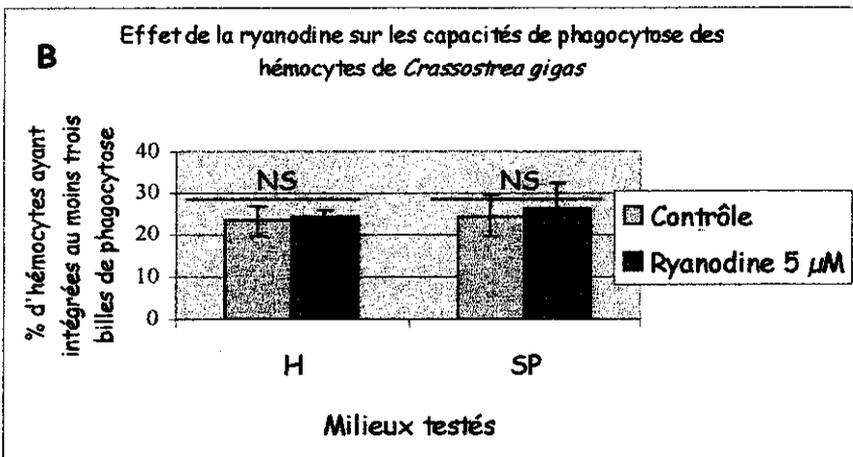
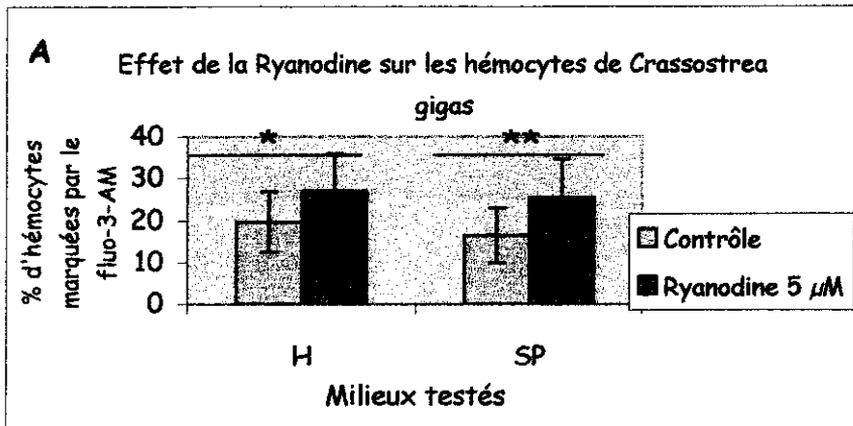


figure 13: Effet de la ryanodine (5 μM) sur calcium intracellulaire (A) et les capacités de phagocytose (B) des hémocytes de *Crassostrea gigas*. *= test de Mann Whitney significatif pour $0.05 < p < 0.01$. **= test de Mann Whitney significatif pour $0.01 < p < 0.001$. NS= différence non significative. Chaque histogramme est la moyenne des résultats obtenus pou 9 échantillons testés plus ou moins l'écart type.

B/Analyse sur cellule isolée par cytofluorimétrie et microscopie confocale.

Les analyses en cellules isolées ont été réalisées afin d'évaluer la quantité de calcium cytoplasmique au repos et après stimulation.

1/ Calibrations

Quantifier la concentration de calcium intracytoplasmique nécessite au préalable de déterminer le ratio de fluorescence maximal (obtenu par la perfusion de la solution 20 Ca) et le ratio minimal de fluorescence (obtenu par la perfusion 0 Ca). Cette démarche demande, en outre, d'obtenir une valeur du coefficient de dissociation (Kd) de la sonde Indo-1 dans le milieu intracytolasmique des hémocytes.

a/ 0 Ca²⁺ et 20 Ca²⁺

Les valeurs des ratios de repos sont variables et oscillent de 0.7 à 2 suivant le lot d'huîtres (10 lots d'environ 20 huîtres ont été testés à raison d'un lot par semaine). Mais, lorsque les valeurs de ratios sont trop élevées, il est difficile d'obtenir des réponses aux perfusions des solutions

de calibration (0 Ca^{2+} et 20 Ca^{2+}). Cette grande variabilité est donc probablement la conséquence de la présence de lots d'huîtres présentant des niveaux de calcium d'emblée très important, peut-être dus au stress des animaux. La valeur du ratio maximal de fluorescence enregistré suite à la perfusion de la solution 20 Ca^{2+} est de 2.0 ± 0.3 (N=4), avec comme valeur la plus forte enregistrée : $R_{\text{max}} = 2.5$. La valeur du ratio minimal de fluorescence enregistré suite à la perfusion de 0 Ca^{2+} est de 0.70 ± 0.36 (N=5) avec comme valeur la plus faible enregistrée : $R_{\text{min}} = 0.4$. Un exemple d'enregistrement est donné en figure 14.

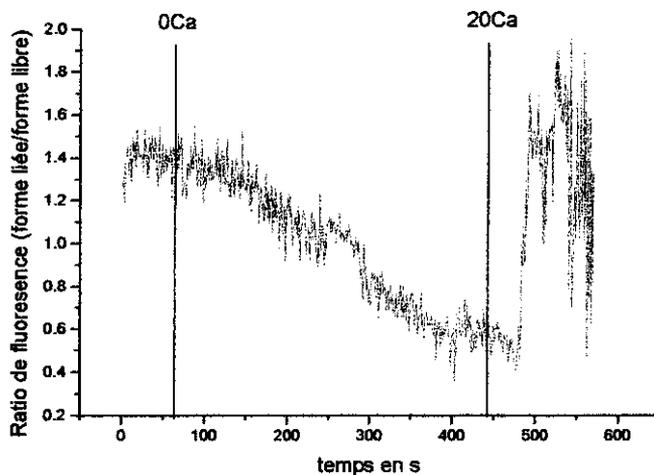


Figure 14: Effet d'une perfusion d'une solution à 0 mM de calcium suivie d'une perfusion d'une solution à 20 mM de calcium sur le ratio de repos d'une hémocytes.

Analyse en cytofluorimétrie avec la sonde calcique indo-1-AM ($6 \mu\text{M}$).

b/ Calcul du K_d

Comme précisé dans le matériel et méthode, le milieu intracellulaire a une composition et une osmolarité différente du milieu intracellulaire des cellules de mammifères; ce qui est susceptible de modifier le comportement des sondes fluorescentes et en particulier leur K_d . Des mesures de fluorescence ont donc été réalisées dans des solutions mimant le milieu intracellulaire des hémocytes (forte osmolarité de 1000 mOsmoles), *in vitro*, afin de suivre l'évolution du ratio de fluorescence en fonction de la concentration de la sonde (0.025 à $25 \mu\text{M}$) et de calcium (33 nM à 1 mM). Les mesures ont été réalisées grâce à la sonde Indo-1 sous forme de sel (c'est à dire sans partie estérifiée) à ces 4 concentrations car nous n'avons aucune idée de la quantité de sonde entrant dans les cellules lors des expérimentations *in vivo*. Chaque courbe de la figure 15 représente donc l'évolution du ratio de fluorescence en fonction des concentrations calciques et ceci à 4 concentrations différentes en Indo-1. Chaque sigmoïde correspond à la régression non linéaire la plus proche des points et a pour équation:

$$Y = R_{min} + (R_{max} - R_{min}) / (1 + 10^{\exp((\log EC_{50} - X) \cdot 3)})$$

Avec $EC_{50} = K_d$ c'est à dire la valeur de X quand $Y = (R_{max} - R_{min}) / 2$. Les valeurs de K_d obtenues sont variables suivant la quantité de sonde introduite dans la solution:

- K_d (0.025 μM indo-1) = 509 nM
- K_d (0.25 μM indo-1) = 458 nM
- K_d (2.5 μM indo-1) = 861 nM
- K_d (25 μM indo-1) = 567 nM

2/ Calcium de repos : différents niveau de calcium suivant le K_d

Nous avons choisi de nous servir des deux valeurs les extrêmes des K_d (458 nM et 861 nM) pour estimer la quantité de $[Ca^{2+}]$ intracytoplasmique (Tableau III) grâce à l'équation de Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985) : $[Ca^{2+}]_i = K_d \cdot B \cdot ((R - R_{min}) / (R_{max} - R))$.

Equation de Grynkiewicz intégrant les valeurs R_{min} et R_{max} obtenues *in vivo* (paragraphe B1a):

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \cdot 1.2 \cdot ((R - 0.7) / (2 - R))$$

Les résultats semblent indiquer que la concentration calcique de repos intracytoplasmique des hémocytes pourrait se situer entre 772 nM (± 716) et 1451 nM (± 1041) selon la valeur du K_d (458 nM et 861 nM) (Tableau III). Mais la variabilité inter-hémocytes reste très élevée du fait de la forte hétérogénéité des ratios de fluorescence des hémocytes au repos.

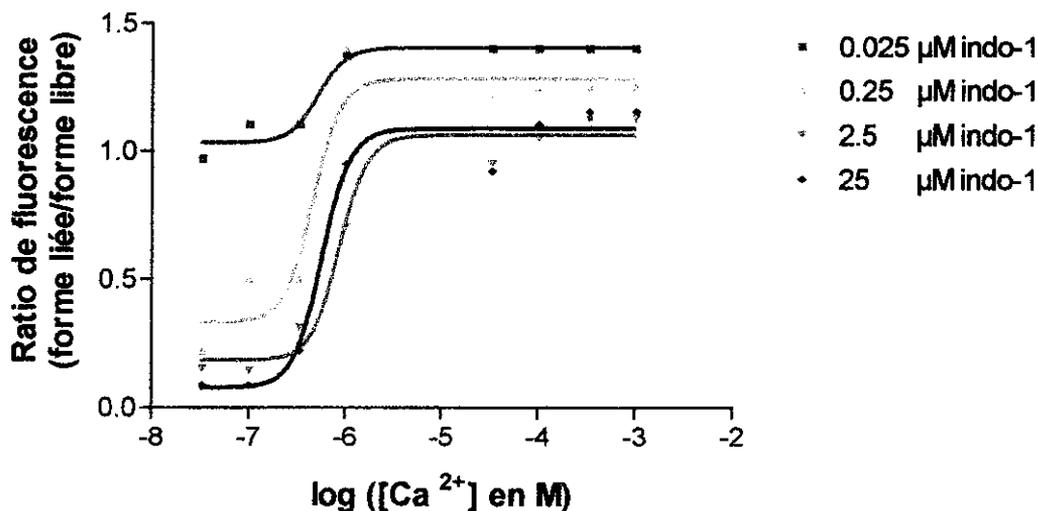


figure 15: évolution du ratio de fluorescence en fonction de la concentration d'ions calcium libres dans le milieu artificiel pour quatre concentrations d'Indo.

3/ Réponse des hémocytes aux stimulations

a/ Pourcentage de réponses hémocytaires

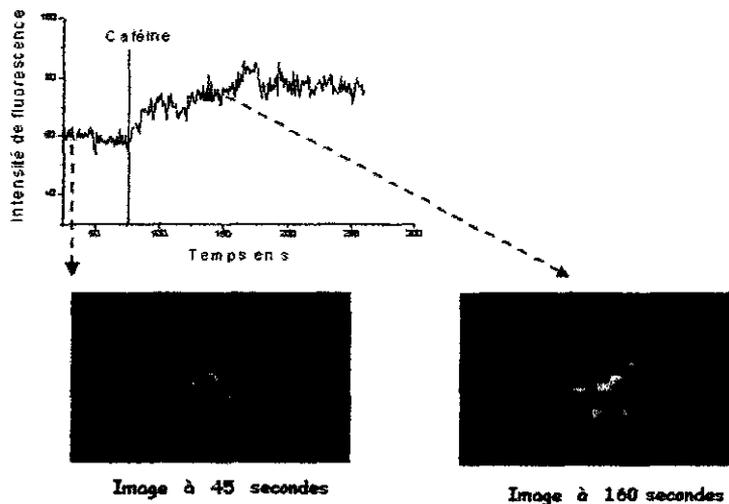


Figure 16: Observation d'un hémocyte en microscopie confocale (BioRad 1024 MRC). Acquisition d'une image toutes les secondes. Les images 45s et 160s ont été sélectionnées pour représenter le niveau de fluorescence de la sonde calcique avant et après la perfusion de la caféine 20 μM . La sonde calcique utilisée était le Fluo-4-AM à 6 μM .

Les réponses obtenues en cytofluorimétrie et microscopie confocale ont montré que 58% des 31 hémocytes testés ont réagi à la perfusion de caféine (Figure 16) et seulement 29% des 24 hémocytes testés, à la solution de 200 K. Enfin, seulement 26% des 19 cellules testées ont réagi à la perfusion de la solution 0 Ca^{2+} et 39% des 18 cellules testées ont réagi à la perfusion de la solution 20 Ca^{2+} .

b/ Variations de la concentration calcique intracytoplasmique hémocytaire suite aux différentes stimulations. Réponses obtenues en cytofluorimétrie (Tableau III).

L'ensemble des valeurs ont été obtenues pour les valeurs de Kd de la sonde Indo-1 de 458 et 861 nM qui constituent les valeurs extrêmes (la plus petite 458 nM et la plus forte 861 nM) de Kd obtenues lors des test *in vitro* (Figure 15).

Tableau III: Concentrations du calcium cytoplasmique sous forme libre ($[Ca^{2+}]_i$) au repos et variation de la concentration cytoplasmique après stimulation. Résultats obtenus grâce à l'équation de Grynkiewicz: $[Ca^{2+}]_i = Kd * B * [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)]$. Avec $B=1.2$; $R=1.3$; $R_{min}=0.4$ et $R_{max}=2.5$. Ces derniers paramètres ont été obtenus grâce à l'analyse des courbes de résultats de cytofluorimétrie. R_{min} = valeur la plus petite obtenue suite à la perfusion 0 Ca^{2+} ; R_{max} = valeur la plus forte obtenue suite à la perfusion 20 Ca^{2+} . Les résultats ont été moyennés plus ou moins l'écart-type.

Kd en nM	458	861
$[Ca^{2+}]_i$ intracytoplasmique de repos en nM N=38	772 ± 716	1451 ± 1041
Variation de la $[Ca^{2+}]_i$ d'un hémocyte perfusé avec du 20 Ca^{2+} N=3	+906 ± 344	+1696 ± 648
Variation de la $[Ca^{2+}]_i$ d'un hémocyte perfusé avec du 0 Ca^{2+} N=5	-314 ± 108	-590 ± 203
Variation de la $[Ca^{2+}]_i$ d'un hémocyte perfusé avec de la caféine 20 μM N=3	+121 ± 49	+227 ± 93
Variation de la $[Ca^{2+}]_i$ d'un hémocyte perfusé avec du 200 N=5	+551 ± 822	+1036 ± 1545

Les augmentations de calcium intracytoplasmique mesurées suite à la perfusion de la solution à 20 mM de calcium se situent entre 906 nM (± 344 nM) et 1696 nM (± 648 nM). Les diminutions de calcium intracytoplasmique mesurées suite à la perfusion de la solution 0 mM de calcium se situent entre 314 nM (± 108 nM) et 590 nM (± 203 nM). Ces variations n'ont été observées que sur un petit nombre de cellules (3 cellules en 20 mM calcium et 5 cellules en 0 mM calcium) et devront être confirmées.

Les augmentations de calcium intracytoplasmique mesurées suite à la perfusion de la solution de caféine à 20 mM se situent entre 121 nM (± 49 nM) et 227 nM (± 93 nM) pour trois cellules analysées. Enfin les enregistrements réalisés suite à la perfusion du 200K montrent une augmentation de la concentration intracytoplasmique (observée chez 5 cellules) se situant entre 551 (± 822) et 1036 (± 1545) selon la valeur du Kd. On observe une très forte variabilité inter-hémocytes dans ce dernier cas.

DISCUSSION

A/Analyse préliminaire de contrôle: effet du SP, du DMSO et des sondes calciques sur la viabilité, certaines activités enzymatiques (estérases et aminopeptidases) et les activités de phagocytose.

La solution d'eau de mer reconstituée (SP) ne semble pas affecter la viabilité des hémocytes. Par contre, cette solution induit significativement une augmentation du nombre d'hémocytes présentant des activités estérases. De la même manière, il a été observé un effet significatif de cette solution sur le pourcentage d'hémocytes présentant des activités aminopeptidases (quasi totale disparition des hémocytes présentant des activités aminopeptidases en SP). La solution de SP semble donc affecter, d'une manière non expliquée, certaines activités enzymatiques des hémocytes. Probablement manque-t-il dans ce milieu artificiel des composants importants présent dans l'hémolymphe qui semblait, dans ces conditions, le milieu le plus adapté. Cependant, devant les difficultés techniques associées à l'utilisation de ce milieu biologique pour étudier les flux calciques en cytofluorimétrie, il a été choisi de travailler en SP. On devra donc réviser ce choix au cas où les expérimentations futures portent sur les activités enzymatiques. Les analyses concernant le DiMéthylSulfOxide (DMSO) n'ont pas montré de toxicité de ce produit à la concentration 1/400 utilisée en cytofluorimétrie et microscopie confocale. Par contre sa toxicité semble avérée dès 1% (Zhang et al., 2002; Prochazca et al., 1997) puisque nous avons observé une diminution significative de l'activité estérase (résultats non montrés). On devra donc toujours se garder d'utiliser des concentrations excessives de DMSO lors de son utilisation comme solvant des composés d'intérêt. Enfin, le fluo-3-AM à 2.5, 5 et 10 μM semble affecter la viabilité et l'Indo-1-AM à 3 et 6 μM semble diminuer sensiblement les activités estérases sans pour autant affecter la viabilité et la phagocytose. Là aussi on devra prendre garde à la concentration finale des sondes afin d'éviter de perturber significativement le comportement, notamment enzymatique, des hémocytes. On devra enfin rappeler les limites actuelles de l'expérimentation sur l'huître: ces animaux sont sous l'influence de nombreux paramètres environnementaux (variation de température, de salinité) non contrôlables par l'expérimentateur lorsqu'elles sont dans leur milieu naturel. Ces variations sont susceptibles de stresser les hémocytes et de les rendre plus sensibles aux produits testés dans certains cas. L'ensemble de ces résultats devrait être vérifié dans des conditions standards et strictement contrôlées c'est à dire sur des huîtres élevées dans des bassins d'eau de mer dont la température, la salinité et l'oxygénation sont contrôlées et maintenues constantes par l'expérimentateur.

B/Concentration calcique cytoplasmique

Après avoir constaté que les variations de niveau de fluorescence induites par les diverses stimulations étaient relativement faibles par rapport à ce qui est habituellement obtenu sur les mammifères, il a été décidé de mesurer le K_d de la sonde Indo-1 pour le calcium dans un milieu se rapprochant des conditions trouvées dans le milieu intracellulaire des cellules de mollusques (en particulier l'osmolarité). Les mesures de K_d *in vitro* en présence de différentes concentrations de calcium et d'Indo ont donc permis, après détermination des valeurs de calibration, de calculer pour la première fois dans ces cellules, la concentration du calcium intracellulaire sous forme libre. Les mesures réalisées montrent que la concentration calcique cytoplasmique de repos moyenne se situerait entre 772 et 1451 nM suivant le K_d utilisé. Ces valeurs sont supérieures à celles trouvées dans la littérature car souvent les auteurs conservent la valeur de K_d des sondes calciques déterminée *in vitro* à 22°C dans 100 mM de KCl, 10 mM de MOPS pH 7.2 et 0 (EGTA) et 10 mM de calcium (pour les calibrations). Ainsi chez la truite arc en ciel, les valeurs de calcium de repos mesurées dans des macrophages (Indo-1-AM, $K_d=250$ nM) est d'environ 300 nM (Duchiron et al., 2001). Les lymphocytes de la carpe commune ont une concentration en calcium cytoplasmique d'environ 100 nM (mesure avec la sonde Indo-1-AM, $K_d=250$ nM) (Reynaud et al., 2002). Enfin les mesures réalisées chez les hémocytes d'un autre mollusque bivalve, la moule (*Mytilus edulis*) indiquent une valeur de calcium cytoplasmique de repos de 71 nM (sonde Fluo-3-AM, $K_d=400$ nM) (Viarengo et al., 1994). Cette dernière valeur est très inférieure à celles que nous avons obtenues. Il est à noter cependant que même si les valeurs de K_d obtenues *in vitro* l'ont été dans des conditions de forte osmolarité, nous n'avons pas tenu compte des protéines et des sucres présents dans le milieu intracellulaire et susceptible de modifier le spectre d'émission de la sonde. Néanmoins on peut raisonnablement s'interroger sur la valeur des résultats obtenus par les auteurs qui ne se sont pas interrogés sur la valeur du K_d .

C/Mécanismes de transferts calciques

La ryanodine 5 μ M et la caféine 20 μ M ont induit une augmentation du calcium intracytoplasmique des hémocytes. Ces deux produits étant connus pour stimuler ou moduler la libération du calcium des stocks internes tels que le réticulum endoplasmique via les RyR, il est donc probable que de tels canaux existent dans les hémocytes et participent à l'augmentation de calcium cytoplasmique nécessaire à certaines de leurs fonctions. En effet, les calculs réalisés suite aux mesures en cytofluorimétrie, ont montrés, dans le cas de la caféine, une augmentation moyenne de 121 nM (ou de 227 nM selon le K_d) ce qui représente 1/7^{ième} de l'augmentation maximale moyenne que l'on peut observer avec la solution 20 Ca^{2+} (906 nM ou 1696 nM selon le

Kd). Cependant ces valeurs n'ont été obtenues que sur l'enregistrement réussi de trois hémocytes. Aussi des mesures complémentaires sur cellules isolées doivent être réalisées. D'autre part, les analyses en cytométrie de flux avec la ryanodine ont montré une augmentation significative des cellules marquées par le Fluo-3 en hémolymphe et en SP suggérant encore une fois que les RyR participeraient à l'augmentation de la concentration cytoplasmique de calcium. Les analyses en cytométrie de flux avec la ryanodine ont de plus montré une très légère augmentation de la phagocytose des billes par rapport au contrôle sans que cela soit significatif selon le test non paramétrique de Mann-Whitney. D'autres analyses en cytométrie de flux ont montré que le chélateur calcique (BAPTA) diminue la concentration en calcium cytoplasmique. Il semble également diminuer les capacités de phagocytose des billes de manière significative, par contre uniquement quand les cellules sont dans leur milieu naturel: l'hémolymphe, mais pas lorsqu'elles sont dans le SP. L'ensemble de ces données pourrait indiquer que le calcium joue bien un rôle dans le mécanisme de phagocytose chez les hémocytes de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. La littérature suggère, en effet, que le calcium est impliqué dans différentes étapes de la phagocytose comme l'induction de la flambée oxydative chez les mammifères comme chez certains invertébrés (Azumi et al., 2002), la formation du phagolysosome qui met en jeu des protéines de liaisons membranaires dépendante du calcium type annexine (Majeed et al., 1997) et dans la libération par les lysosomes d'enzymes hydrolytiques type peroxydases dans le phagosome (Rodriguez et al., 2003). Enfin, peu d'hémocytes ont réagi au 200 K (29% sur 24 hémocytes testés) lors des études en cytofluorimétrie et nous n'avons pas testés le 200 K en cytométrie de flux. De plus les augmentations de la concentration calcique cytoplasmique mesurées chez seulement cinq cellules présentent une telle variabilité qu'il est difficile de conclure quant à l'implication de canaux calciques membranaires voltages-dépendants dans l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$. Certains auteurs ont déjà suggéré la faible implication du calcium externe dans ces mécanismes de capture du pathogène chez les neutrophiles de mammifères (Stendahl et al., 1994).

CONCLUSION/PERSPECTIVES

Ce travail a permis d'évaluer pour la première fois le niveau de calcium sous forme libre dans les hémocytes d'huîtres creuses et a permis de mettre en évidence des flux calciques. De plus, les résultats obtenus indiquent que les hémocytes sont capables d'augmenter leur quantité de calcium cytoplasmique via les RyR localisés au niveau d'organites de stockage de calcium tels que le réticulum endoplasmique mais des expériences complémentaires doivent être réalisées pour confirmer ces résultats. La présence de canaux calciques voltage-dépendants au niveau de leur

membrane plasmique n'a pas été mis en évidence. Enfin, les résultats pourraient suggérer que des variations de la concentration calcique cytoplasmiques modifient les capacités de phagocytose du pathogène. D'autres analyses devront être réalisées pour approfondir et valider ces premiers résultats. A plus long terme il sera probablement possible de passer à l'étape supérieure à savoir étudier l'impact de polluants sur les transferts calciques que nous avons commencé à mettre en évidence chez l'huître *Crassostrea gigas*.

BIBLIOGRAPHIE:

- Auffret (1989). Comparative study of the hemocytes of two oyster species: the European flat oyster, *Ostrea edulis*, and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 8 (2): 367-373.
- Auffret, Oubella (1994). Cytometric parameters of bivalve molluscs: effects of environmental factors. SOS Publications, Fair Haven, USA. 1: 23-32.
- Azumi, Kuribayashi, Kanegasaki, Yokosawa (2002). Zymosan induces production of superoxide anions by hemocytes of the solitary ascidian *Halocynthia roretzy*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 133: 567-74.
- Ballarin, Cima, Sabbadin (1997). Calcium homeostasis and Yeast Phagocytosis in Hemocytes of the Colonial Ascidian *Botryllus schlosseri*. *Comparative Biochemistry.* 118 (1): 153-158.
- Chagot (1989). Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes d'*Ostrea edulis* et de *Crassostrea gigas*, mollusques bivalves. Etude in vitro de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (Ascetospora). thèse du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes.
- Cheng (1981). Bivalves. In invertebrate Blood Cells (Ratcliffe, Rowley, eds). *Academic Press*, London. 233-299.
- Duchiron, Reynaud, Deschaux (2001). Lindane-induced macrophage activating factor (MAF) production by peripheral blood leukocytes (PBLs) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): involvement of intracellular cAMP mobilization. *Aquatic Toxicology.* 56: 81-91.
- Ferrandon et Royet (2002). La drosophile: un modèle immunitaire pour l'étude de la réponse immunitaire des invertébrés. *Regard sur la biochimie* N°1.
- Fisher, Wishkovsky, Chu (1990). Effects of tributyltin on defense-related activities of oyster hemocytes. *Arch. Env. Contam. Toxicol.* 19: 354-360.
- Gagnaire, Renault, Bouilly, Lapegue, Thomas-Guyon (2003). Study of Atrazine on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. *Curr. Pharm. Des.* 9(2): 193-9.
- Gomez, Potreau and Raymond (1994). Intracellular calcium transients from newborn rat cardiomyocytes in primary culture. *Cell Calcium.* 15(4): 265-275.
- Grynkiewicz, Poenie and Tsien (1985). A new generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. *The Journal of Biological Chemistry.* 260(6):3440-3450.
- Harwood, Horwarth, Altringham, White (2000). Rate-dependant changes in cell shortening, intracellular Ca²⁺ levels and membrane potential in single, isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ventricular myocytes. *J. Exp. Biol.* 203 (3): 493-504.
- Holmblad et Söderhäll (1999). Cell adhesion molecules and antioxydative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture.* 172(1-2): 111-123.

Imai et Kohsara (2002). Intracellular Signaling in M-CSF-Induced Microglia Activation. Role of Iba1. *GLIA*. 40: 164-174.

Majeed, Perskvist, Ernst, Orselius, Stendhal (1997). Role of calcium and annexins in phagocytosis and elimination of an attenuated strain of *Mycobacterium tuberculosis* in human neutrophils. *Microbial Pathogenesis*. 24(5): 309-320.

Marks et Maxfield. Local global changes in cytosolic free calcium in neutrophils during chemotaxis and phagocytosis. *Cell Calcium*. 11: 181-190.

Mitta, Vandenbulcke et Roch. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett*. 486(3): 185-90.

Müller-Taubenberger, N. Lupas, Li, Ecke, Simmeth et Gerish (2001). Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis. *The EMBO Journal*. 20(23): 6772-6782.

Nicholson (2001). Ecocytological and toxicological responses to copper in *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) haemocyte lysosomal membranes. *Chemosphere*. 45: 399-407.

O'Neill et Eisner (1990). A mechanism for the effects of caffeine on Ca^{2+} release during diastole and systole in isolated rat ventricular myocytes. *J. Physiol*. 430: 519-536.

Ottaviani et Franceschi (1997). The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems. *Immunology Today*. 18 (4): 169-174.

Ottaviani, Franchini et Kleitsas (2001). Platelet-derived growth factor and transforming growth factor in invertebrate immune and neuroendocrine interactions: another sign of conservation in evolution. *Comparative Biochemistry and Physiology Part*. 295-306.

Oubella (1996). Réponse immunitaire chez les mollusques bivalves. Effets de facteurs environnementaux sur le système de défense interne. Thèse de Doctorat d'Université mention Océanographie Biologique.

Oubella et Auffret. Immuno-modulation in populations of molluscs bivalves from the Rade de Brest. Contribution N° 95-001 de URA CNRS D1513.

Pareck (2002). Store-operated Ca^{2+} entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane. *Journal of Physiology*. 547(2): 33-348.

Pareck et Penner (1995). Activation of store-operated calcium influx at resting $InsP_3$ levels by sensitization of the $InsP_3$ receptor in rat basophilic leukaemia cells. *Journal of Physiology*. 489(2): 377-382.

Putney (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*. 7: 1-12.

Prochazka et Schellander (1997). Effect of protein kinase C stimulators on activation of bovine oocytes. *Theriogenology*. 47(1): 211.

Rämet, Manfruelli, Pearson, Mathey-Prevot et Ezekowitz (2002). Functionnal genomic analysis of phagocytosis and identification of a drosophila receptor for E. coli. *Nature*. 416: 644-648.

Reynaud, Duchiron, Deschaux (2002). 3-Methylcholanthrene inhibits lymphocyte proliferation and increases intracellular calcium levels in common carpe (*Cyprinus carpio* L). *Aquatic Toxicology*. 63: 319-331.

Roch (1999). Defense mechanisms and diseases prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*. 172(1-2): 125-145.

Rodriguez, esteban, Meseguer (2003). Phagocytosis and peroxidase release by seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes in response to yeast cells. *Anat Rec*. 272A(1): 415-423.

Seastone, Zhang, Buczynski, Rebstein, Weeks, Spiegelman, Cardelli (1998). The small Mr Ras-like GTPase Rap1 and the Phospholipase C Pathway Act to Regulate Phagocytosis in Dictyostelium discoideum. *Molecular Biology of the Cell*. 10: 393-406.

Söderhall et Cerenius (1998). Role of the prophenoloxdase-activating system in invertebrate immunity. *Innate Immunity*. 10: 23-28.

Stendahl, Krause, Krischer (1994). Redistribution of intracellular Ca²⁺ stores during phagocytosis in human neutrophils. *Science*. 265: 1439-1441.

Thelen, Dewald et Baggiolini. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol. Rev*. 73: 797-821.

Tripp (1992). Phagocytosis by hemocytes of the hard clam, *Merceneria merceneria*. *J. invertebr. Pathol*. 59: 222-227.

Tujula, radford, Nair, Raftos (2001). Effects of tributyltin and other metals on the phenoloxidase activating system of the tunicate, *Styela plicata*. *Aquatic Toxicology*, 55: 191-201.

Viarengo, Canesi, Moore et Orunesu (1994). Effect of Hg²⁺ and Cu²⁺ on the cytosolic Ca²⁺ level in molluscan blood cells evaluated by confocal microscopy and spectrofluorimetry. *Marine Biology*. 119: 557-564.

Xue et Renault (2000). Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and pacific oyster, *crassostrea gigas*, hemolymph. *J Invertebr Pathol*. 76(3): 155-63.

Yuan, Siu et Chia (2001). Calcium requirement for efficient phagocytosis by dictyostelium discoideum. *Cell calcium*. 29(4): 229-238.

Zhang, Needham, Coffin, Rooker, Hurban, Tanzer, Schuster (2002). Microarray analyses of the metabolic responses of *saccharomyces cerevisiae* to organic solvent dimethyl sulfoxide. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 30: 57-69.